

**Stabilität und Aktivität ausgewählter Enzymsysteme unter  
extremen Umweltbedingungen**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt von

**MICHEL WERNER JAWOREK**

geboren am 10. März 1992 in Dortmund

eingereicht bei der Fakultät  
für Chemie und Chemische Biologie  
der Technischen Universität Dortmund

**Dortmund, November 2020**



## EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG (AFFIDAVIT)

Jaworek, Michel Werner

Name, Vorname (Surname, first name)

\_\_\_\_\_  
Matrikel-Nr. (Enrolment number)

### Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, §63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

### Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund,

Ort, Datum (Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift (Signature)

Titel der Dissertation (Title of the thesis):

### **Stabilität und Aktivität ausgewählter Enzymsysteme unter extremen Umweltbedingungen**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

**\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Dortmund,

Ort, Datum (Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift (Signature)

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Technischen Universität Dortmund im Zeitraum von Mai 2017 bis Juli 2020 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter durchgeführt.

Dissertation eingereicht am: 04. November 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2020

Prüfungskommission:

Prüfungsvorsitzende: Prof. Dr. Susanne Brakmann

Erster Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Claus Czeslik

*für meine Familie*

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Sir Isaac Newton (1643-1727)





## Danksagung

Allen voran bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Roland Winter, interessante Fragestellungen innerhalb seiner Forschungsgruppe untersuchen zu dürfen, sowie für die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der gesamten Zeit. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit, Forschungsergebnisse im In- und Ausland präsentieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik danke ich für die Übernahme des Korreferats, sowie für seine stetige Verfügbarkeit bei fachlichen Fragestellungen.

Ein besonderer Dank geht an Andrea Jeworrek für die Hilfe bei allen organisatorischen und verwaltungstechnischen Angelegenheiten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Simone Möbitz für die Erläuterungen und Hilfe bei der Expression und Aufreinigung einiger Proteine.

Ebenfalls danke ich Dr. Vitor Schuabb, Dr. Mimi Gao und Stewart Gault für die kooperative Zusammenarbeit während der Promotionszeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Mechanikwerkstatt der Fakultät CCB unter Leitung von Herrn Konopka für die Behebung zahlreicher mechanischer Probleme, die während dieser Arbeit auftraten.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physikalische Chemie I für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Hierbei möchte ich Jim Knop und Marius Herzog hervorheben, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützt haben.

Ein großen Dank geht an meine Familie, die mir während des gesamten Studiums Rückhalt gegeben haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Katalysereaktionen .....	5
1.2 Proteinstabilität.....	11
1.3 Astrobiologische Fragestellungen .....	14
<b>2. Experimentelle Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Hochdruck-Stopped-Flow-Methode.....	18
2.1.1 Theoretische Grundlagen .....	18
2.1.2 Experimentelles.....	20
2.2 FOURIER-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie.....	22
2.2.1 Theoretische Grundlagen .....	22
2.2.2 Experimentelles.....	24
<b>3. Einfluss von Glycin, TMAO und Osmolytgemischen auf die druckabhängige katalytische Aktivität von <math>\alpha</math>-Chymotrypsin</b> .....	<b>30</b>
3.1 Einleitung .....	30
3.2 Probenpräparation.....	32
3.3 Ergebnisse und Diskussion.....	35
3.4 Zusammenfassung .....	40
<b>4. Druck- und Cosolvens-Modulation der katalytischen Aktivität von Amyloidfibrillen</b> .....	<b>44</b>
4.1 Einleitung .....	44
4.2 Probenpräparation, Peptidsynthese und Fibrillenbildung.....	46
4.3 Ergebnisse und Diskussion.....	47
4.4 Zusammenfassung .....	52
<b>5. Stabilität des Chaperonin-Systems GroEL/GroES unter extremen Umgebungsbedingungen</b> .....	<b>55</b>
5.1 Einleitung .....	55
5.2 Probenpräparation.....	57
5.3 Ergebnisse und Diskussion.....	59
5.4 Zusammenfassung .....	69

<b>6. Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des ArgBP <i>Thermotoga maritima</i> und seiner gefalteten Fragmente.....</b>	<b>71</b>
6.1 Einleitung .....	71
6.2 Probenpräparation.....	73
6.3 Ergebnisse und Diskussion.....	74
6.4 Zusammenfassung .....	81
<b>7. Druckeinfluss auf die Enzymaktivität unter Perchlorat-Stress: Auswirkungen auf die Bewohnbarkeit des Mars.....</b>	<b>82</b>
7.1 Einleitung .....	82
7.2 Probenpräparation.....	83
7.3 Ergebnisse und Diskussion.....	84
7.4 Zusammenfassung .....	93
<b>8. Optimierung der Formiatdehydrogenase-Aktivität durch Cosolute, Temperatur und Druck.....</b>	<b>96</b>
8.1 Einleitung .....	96
8.2 Probenpräparation.....	98
8.3 Ergebnisse und Diskussion.....	101
8.4 Zusammenfassung .....	109
<b>9. Erforschung der enzymatischen Aktivität im Multiparameterraum: Cosolventien, makromolekulare <i>Crowder</i> und Druck .....</b>	<b>111</b>
9.1 Einleitung .....	111
9.2 Probenpräparation.....	114
9.3 Ergebnisse und Diskussion.....	115
9.4 Zusammenfassung .....	123
<b>10. Fazit und Ausblick .....</b>	<b>125</b>
<b>i. Anhang .....</b>	<b>I</b>
i.1 Übersicht der Chemikalien .....	I
i.2 Übersicht der Geräte und Materialien .....	III
i.3 Daten aus dem Projekt: Einfluss von Glycin, TMAO und Osmolytgemischen auf die druckabhängige katalytische Aktivität von $\alpha$ -Chymotrypsin .....	IV
i.4 Daten aus dem Projekt: Stabilität des Chaperonin-Systems GroEL/GroES unter extremen Umweltbedingungen.....	VI

i.5 Daten aus dem Projekt: Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des Arginin-Bindungsproteins <i>Thermotoga maritima</i> und seiner gefalteten Fragmente .....	IX
i.6 Daten aus dem Projekt: Druckeinfluss auf die Enzymaktivität unter Perchloratstress: Auswirkungen auf die Bewohnbarkeit des Mars .....	XIV
i.7 Daten aus dem Projekt: Erforschung der enzymatischen Aktivität im Multiparameterraum: Cosolventien, makromolekulare <i>Crowder</i> und Druck.....	XVI
i.8 Daten aus dem Projekt: Optimierung der Formiatdehydrogenase-Aktivität durch Cosolute, Temperatur und Druck.....	XX
i.9 Abkürzungsverzeichnis .....	XXII
i.10 Tabellenverzeichnis.....	XXIV
i.11 Abbildungsverzeichnis .....	XXVI
i.12 Literaturverzeichnis.....	XXX
<b>ii. Publikationsliste .....</b>	<b>XLI</b>
<b>iii. Konferenzbeiträge.....</b>	<b>XLII</b>

## Kurzzusammenfassung

In allen Organismen fungieren Enzyme als Biokatalysatoren, welche die erforderliche Aktivierungsenergie chemischer Reaktionen drastisch herabsetzen, wodurch diese unter milden Konditionen, d. h. unter den in lebenden Zellen herrschenden Bedingungen, schneller ablaufen können. Enzyme weisen im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren eine höhere Substrat- und Reaktionsspezifität auf, bei der höhere Ausbeuten mit einem Enantiomerüberschuss erzielt werden können. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften sind Enzyme, auch für diverse industrielle Anwendungen, äußerst attraktiv. Insbesondere in der Biomedizin, Pharma- und Lebensmittelindustrie kommt der Einsatz dieser Biokatalysatoren in den letzten Jahren vermehrt zum Einsatz. Allerdings ist ihr Gebrauch für industrielle Prozesse mit hohen Produktionskosten verknüpft. Außerdem ist die Stabilität des Enzyms vor allem hinsichtlich längerer Zeitspannen in den Reaktoren limitiert. Um die Nachhaltigkeit der Enzyme zu optimieren, werden mittels *Protein engineering* und Immobilisierungstechniken sowie durch die Verwendung von chemischen Additiven und Änderung physikalischer Parameter Enzymreaktionen erforscht. Des Weiteren kann mithilfe dieser Werkzeuge die katalytische Effizienz verbessert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Drucks, der Temperatur, verschiedener Cosolventien und makromolekularer *Crowder* auf die Stabilität und Aktivität ausgewählter Enzymsysteme untersucht. Bei Anwendung des hydrostatischen Drucks werden Reaktionsgeschwindigkeiten entweder erhöht oder verlangsamt. Des Weiteren können bei bestimmten Drücken Proteine auch partiell entfalten, welche mit einem Aktivitätsverlust einhergehen kann. Cosolventien, wie z. B. Trimethylamin-*N*-oxid, welche häufig in hoher Konzentration in Zellen von Tiefseeorganismen vorliegen, sind in der Lage, schädliche Umwelteinflüsse auf biomolekulare Systeme zu kompensieren, und zudem, wie bereits in einigen Studien gezeigt wurde, die Stabilität von Proteinen zu verbessern. Mithilfe der Hochdruck-Stopped-Flow-Messungen wurden die enzymatischen Untersuchungen durchgeführt, wohingegen die Analyse der Stabilität der Sekundärstruktur mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie erfolgte.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass bei den untersuchten Enzymsystemen die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmendem Druck um ein Vielfaches beschleunigt wird. Die Beschleunigung der Reaktion unter Druck kommt durch das negative Aktivierungsvolumen zustande. Hierbei ist der Übergangszustand kompakter als der Enzym-Substrat-Komplex. Die dabei ermittelten molaren Volumenänderungen entsprechen ungefähr den

Größenordnungen eines Wassermoleküls. Der Einfluss des Drucks auf die MICHAELIS-Konstante wirkte sich, je nach Enzym, positiv oder negativ auf die Affinität zum Substrat aus. Bezüglich der Wechselzahl konnte fast ausnahmslos eine Erhöhung ihres Wertes mit zunehmenden Druck erreicht werden. Damit konnte bei allen untersuchten enzymkatalysierten Reaktionen ein Anstieg der katalytischen Effizienz bei höheren Drücken beobachtet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Crowder*-Moleküle und Cosolventien unterschiedliche Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität haben und diese hauptsächlich auf direkte und indirekte Wechselwirkungen des Cosolute mit dem Substrat, Protein oder Lösungsmittel zurückgeführt werden können. Als hilfreich können sich, wie an einem Beispiel gezeigt wurde, Modellierungsansätze wie *perturbed-chain statistical associating fluid theory* erweisen, um den Einfluss der Cosolute auf die MICHAELIS-Konstante quantitativ zu prognostizieren. Jedoch ist die Aufklärung des Reaktionsmechanismus auf atomarer Ebene in komplexen Lösungsmittelgemischen sowie das Erzielen der bestmöglichen Leistung eines Enzym im Multiparameterraum, die für industrielle Prozesse von großem Interesse sind, noch weitgehend lückenhaft. Nichtsdestotrotz dienen die Forschungsergebnisse an solch einfachen Modellen dazu, Enzymkinetiken schrittweise zu entschlüsseln.

Zusätzlich ist es auch von enormer Bedeutung, neben der Aktivität die Stabilität eines Enzyms im Multiparameterraum zu untersuchen. Exemplarisch konnte beim GroEL/GroES-System eine bemerkenswerte Temperaturstabilität ermittelt werden, die durch kompatible Cosolventien wie TMAO noch leicht erhöht werden konnte. Hinsichtlich der Druckstabilität konnte für den Komplex eine druckinduzierte Dissoziation bei niedrigen Drücken im niedrigen kbar-Bereich beobachtet werden. Die Zugabe chemischer Additive ergab, dass diese sich entweder positiv (TMAO) oder negativ (Harnstoff) auf die Druck- und Temperaturstabilität der Sekundärstruktur auswirken können. Anhand der untersuchten Enzymsysteme konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität und Stabilität unter extremen Umweltbedingungen weiterhin gewährleistet ist oder sogar noch optimiert werden konnte. Diese Erkenntnisse könnten zukünftig für industrielle Prozesse von Nutzen sein. Anhand der Ergebnisse können auch teilweise Rückschlüsse auf die Lebensfähigkeit einiger Mikroorganismen erhalten werden. Da das Leben auf der Erde sich im Laufe der Geschichte vielfältig, wahrscheinlich ursprünglich in den Tiefen des Ozeans bei hohen Drücken, entwickelt hat und selbst heutzutage noch in vielen ökologischen Nischen vorzufinden ist, bei denen Organismen extremen Umweltfaktoren ausgesetzt sind, kann gemutmaßt werden, dass auch außerhalb der Erde Leben möglich sein könnte, auch wenn die Voraussetzungen andere sind.

## Abstract

In organisms, enzymes act as biocatalysts that drastically reduce the required activation energy of chemical reactions, which allows them to proceed more rapidly under mild conditions, i.e. under the conditions prevailing in living cells. In contrast to chemical catalysts, enzymes have a higher substrate specificity and specificity of action, where higher yields can be achieved with an excess of enantiomers. Due to these special properties, enzymes are also extremely attractive for various industrial applications. Especially in the biomedical, pharmaceutical and food industries, the use of these biocatalysts has increased in recent years. However, the applicability of enzymes to biotechnology is often limited by high production costs and low enzyme stability of the enzyme over industrial timescales. In order to optimize the sustainability of the enzymes, enzyme reactions are investigated by means of protein engineering, immobilization techniques, use of chemical additives and application of physical parameters. These tools can also be used to improve catalytic efficiency. In this work, the influence of pressure, temperature, cosolvents and macromolecular crowders on the stability and activity of selected enzyme systems was investigated. When hydrostatic pressure is applied, reaction rates are either increased or decreased, and proteins partially unfolded at certain pressures, which can be accompanied by a loss of activity. Cosolvents, such as Trimethylamine-*N*-oxide, which are often present in high concentrations in the cells of deep-sea organisms, are able to compensate for harmful environmental stresses on biomolecular systems, as has already been shown in several studies. The enzymatic investigations were carried out using a high pressure stopped-flow instrument, whereas the analysis of the stability of the secondary structure was carried out using FTIR spectroscopy.

Based on the obtained results, it was found that in the enzyme systems investigated, the reaction rate was accelerated many times with increasing pressure. The acceleration of the reaction under pressure results from a negative activation volume, where the transition state is more compact than the enzyme-substrate complex. The volume changes determined correspond approximately to the size of one water molecule. The influence of pressure on the Michaelis constant impacted the affinity to the substrate both positively and negatively, whereas the turnover number was increased with increasing pressure, almost without exception. Consequently, an increase in catalytic efficiency at higher pressures was observed in all investigated enzyme-catalyzed reactions. Furthermore, it was shown that crowder molecules and cosolvents have varied effects on the enzymatic activity, which can mainly be attributed to direct and indirect interactions of the cosolute with the substrate, protein or solvent.

As shown in one example, modeling approaches such as *perturbed-chain statistical associating fluid theory* can be very helpful to quantitatively predict the influence of the cosolute on the Michaelis constant. However, the elucidation of the reaction mechanism at the atomic level in complex solvent mixtures in the multiparameter space, and the achievement of the best possible performance of an enzyme, which are of great interest for industrial processes, is still largely beyond the reach of computation. Nevertheless, results based on such simple models help to decipher and optimize enzyme kinetics step by step.

In addition to the activity, it is also of enormous importance to investigate the stability of an enzyme in the multiparameter space. As an example, the GroEL/GroES system shows a remarkable temperature stability, which could be slightly increased by compatible cosolvents such as TMAO. With regard to pressure stability, pressure-induced dissociation at low pressures in the kbar-range was observed for the complex, which was also typically observed for other oligomeric enzymes. The addition of chemical additives revealed that these can have either a positive or a negative effect on the pressure and temperature stability of the secondary structure.

Based on the enzyme systems investigated, it was shown that the functionality and stability under extreme environmental conditions is still guaranteed or could even be improved. These findings could be useful for industrial processes in the future.

The results can also be used to make partial conclusions about the viability of some organisms. Since life on Earth has developed in many ways throughout history, probably originally in the depths of the primordial ocean at high pressures, and even today can still be found in many ecological niches where organisms are exposed to extreme environmental factors, it can be assumed that life could also be possible outside the Earth, even if the conditions for life are different.

# 1. Einleitung

## 1.1 Katalysereaktionen

Jedes Lebewesen weist ein breites Spektrum an biochemischen Reaktionen auf, die durch eine Reihe biologischer Katalysatoren vermittelt werden. Katalysatoren, die Reaktionen stark beschleunigen, indem sie einen alternativen Reaktionsweg mit einer abgesenkten Energiebarriere ermöglichen, werden als Enzyme bezeichnet. Im Vergleich zu entsprechenden chemischen Katalysatoren erhöhen Enzyme die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der ein Substrat in das jeweilige Produkt umgewandelt wird, um einige Größenordnungen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Enzyme ist die größere Substratspezifität, die mit einer höheren Ausbeute verbunden ist. Somit würde ohne diese Katalysatoren oder ihre bemerkenswerten charakteristischen Eigenschaften das Leben auf der Erde in der jetzigen Form höchstwahrscheinlich nicht existieren.<sup>[1,2]</sup>

Aufgrund der Vielzahl biochemischer Katalysatoren wurde eine systematische Klassifizierung und Nomenklatur eingeführt, die hinsichtlich des Reaktionstyps in Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen gewählt worden ist.<sup>[3]</sup> Für einen Teil der Reaktionsklassen werden jedoch zusätzlich zu dem Enzym weitere Moleküle benötigt, die für den Umwandlungsprozess essentiell sind. Diese sogenannten Cofaktoren können beispielsweise Metallionen oder organische Coenzyme (u. a. NADH, Coenzym A, ATP) sein, welche mit dem Enzym interagieren und während der Reaktion chemisch verändert werden. Um den Reaktionszyklus aufrechtzuerhalten, werden die Cofaktoren mittels anderer Enzyme regeneriert.<sup>[2]</sup> Meist fungieren Cofaktoren als Elektronendonatoren- und akzeptoren in Redoxreaktionen oder als Donor oder Akzeptor in Transferprozessen von Atomen oder Atomgruppen.<sup>[1,2]</sup>

In den letzten Jahrzehnten hat ein Kurswechsel von der herkömmlichen klassischen Industrie (Synthesereaktionen) zur Enzymindustrie stattgefunden, die durch die Entwicklung der modernen Biotechnologie zu erklären ist.<sup>[4,5]</sup> Angesichts der genannten Enzymcharakteristika ist es auch wenig überraschend, dass Biokatalysatoren heutzutage in vielen industriellen Sektoren, wie z. B. der Lebensmittel-, Pharma-, Landwirtschafts- und Kosmetikindustrie, eine besondere Rolle eingenommen haben.<sup>[3,4,6]</sup> Enzyme sind unter anderem entscheidend für die Käseherstellung, das Bierbrauen, das Brotbacken, die Fruchtsaftgewinnung und das Gerben von Leder.<sup>[4]</sup> Aus ökonomischer Sicht hat sich der Einsatz hocheffizienter Biokatalysatoren besonders profitabel erwiesen, da Reaktionen unter mildereren Reaktionsbedingungen kontrolliert und beschleunigt werden können, um schnell und gezielt ein qualitativ hochwertiges Endprodukt zu erhalten.

Auch können durch den Einsatz von Enzymen die Produktionskosten, zum Beispiel im Bereich des Energiebedarfs, das Abfallaufkommen sowie die Umwelt- und physiologische Toxizität gesenkt werden.<sup>[3,5]</sup> Um eine Anwendung und wirtschaftliche Wettbewerbsfähigkeit in weiteren Industriezweigen zu gewährleisten, müssen Aspekte wie die chemische sowie thermische Stabilität und Langzeitstabilität des Enzyms ebenso wie die Kostenreduktion der Enzymproduktion aus natürlichen Bakterienstämmen optimiert werden.<sup>[5,6]</sup> Daher werden heutzutage im industriellen Maßstab stabilere und robustere Biokatalysatoren erforscht. Mithilfe neuester Technologien, wie dem *Protein engineering*, insbesondere der gerichteten Evolution, wurde die Entwicklung industrieller Enzyme dahingehend weiter revolutioniert.<sup>[4,5]</sup> Basierend auf einer zufallsbasierten Mutagenese und der nachfolgenden Selektion können so maßgeschneiderte Enzyme mit verbesserten Fähigkeiten entwickelt werden.<sup>[3,5]</sup> Die Expression größerer Mengen an Enzymen erfolgt dabei meist mittels mikrobieller Quellen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*).<sup>[3]</sup>

Der hohe Verbrauch von Cofaktoren, wie NADH oder NADPH, in industriellen Enzymsystemen zur Herstellung chiraler Alkohole ist mit hohen Kosten (> US\$ 12000/kg) verbunden.<sup>[7]</sup> NAD<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenasen besitzen die Fähigkeit, diese Cofaktoren zu recyceln.<sup>[8]</sup> Ein Projekt in dieser Arbeit befasst sich daher mit der Formiatdehydrogenase (FDH) (Kapitel 8), welche die Oxidation eines Formiat-Anions zu Kohlendioxid mit gleichzeitiger Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH katalysiert und eines der geeignetsten sowie einfachsten Enzymmodelle zur Untersuchung des Hydridionentransfers darstellt. Zu der wichtigsten industriellen Anwendung von FDHs neben der Nicotinamidadenindinukleotid-Regenerierung zählt die Kohlenstoffdioxid-Fixierung.<sup>[9-11]</sup>

Ferner können enzymatische Reaktionen über externe Einflüsse, wie Druck, Temperatur, pH-Wert oder chemische Substanzen, beeinflusst werden, welche z. B. die Stabilität und Aktivität des Proteins verändern können. Der Parameter Druck in Kombination mit Biokatalysatoren hat sich in der Industrie im 21. Jahrhundert als besonders nützlich erwiesen, um beispielsweise organische und anorganische Synthesen zu optimieren sowie Lebensmittel durch Abtötung von pathogenen Mikroorganismen und Hefe zu konservieren.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde das HABER-BOSCH-Verfahren entwickelt, welches eines der ersten chemischen Prozesse in der Industrie darstellt, in dem Drücke von etwa 200 bar zur Ammoniaksynthese eingesetzt wurden.<sup>[12]</sup> Der Einsatz von hohen Drücken in anderen industriellen Prozessen (Diamantensynthese, Herstellung von Polyethylenen mit niedriger Dichte) war

zur damaligen Zeit ein Sonderfall.<sup>[12]</sup> Chemische Prozesse wurden zum Großteil unter normalen physikalischen Bedingungen (25 °C, 1 atm) durchgeführt.

Wissenschaftliche Arbeiten über das Verhalten von Enzymen unter Druck wurden von Pionieren wie EDDIE MORILD und HENRY EYRING erstmalig veröffentlicht.<sup>[13,14]</sup> Darin wurde veranschaulicht, dass es möglich ist, detaillierte Einblicke in die Reaktionsmechanismen in Abhängigkeit des Drucks zu erhalten. Hierbei können Volumenänderungen ermittelt werden, die das Erstellen von Reaktionsvolumenprofilen erlaubt, wie beispielweise in Abbildung 1-1 grafisch gezeigt. Derartige Erkenntnisse können für die Kontrolle und Optimierung chemischer Prozesse von Nutzen sein können.

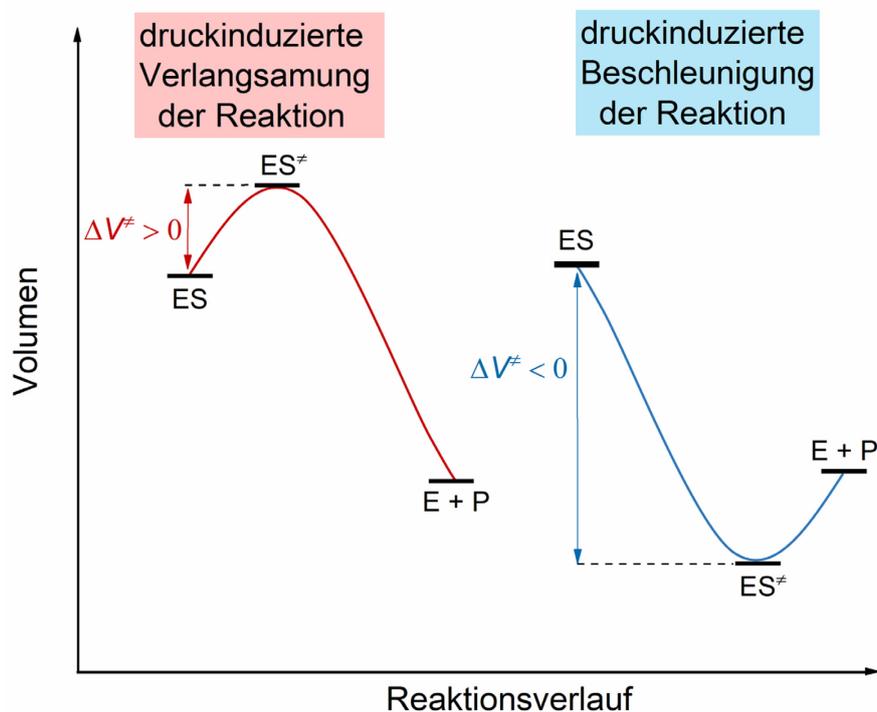


Abbildung 1-1: Vereinfachte Darstellung der Volumenänderung einer hypothetischen enzymatischen Reaktion, bei der der Enzym-Substrat-Komplex (ES) in das freie Enzym (E) und Produkt (P) umgewandelt wird. Weist der Übergangszustand (ES<sup>‡</sup>) ein größeres Volumen als der Enzym-Substrat-Komplex auf, ist das Aktivierungsvolumen  $\Delta V^\ddagger$  positiv und die enzymatische Reaktion wird bei Druckeinwirkung verlangsamt. Bei einem negativen Aktivierungsvolumen wird die Reaktionskinetik beschleunigt, da der Übergangszustand ein kleineres Volumen als der Enzym-Substrat-Komplex besitzt und somit die Reaktion unter Druck favorisiert ist.

Es gibt jedoch verschiedene Faktoren, die die Leistung des Enzyms unter hohem hydrostatischen Druck beeinträchtigen können. Einerseits können Enzyme unter Anwendung des Drucks entfalten, da der entfaltete Zustand gegenüber dem nativen Zustand, gemäß dem Prinzip von LE-CHÂTELIER, aufgrund des kleineren Volumens favorisiert ist.<sup>[15,16]</sup> Die Druckentfaltung

bzw. druckinduzierte Konformationsänderung kann zu einem Funktionsverlust des Enzyms oder einer drastischen Reduktion der Enzymaktivität führen.<sup>[17]</sup> Des Weiteren wurden bei oligomeren Enzymen unter moderaten Drücken (< 3000 bar) Dissoziationsprozesse beobachtet,<sup>[14,18]</sup> die die Aktivität des Enzyms drastisch einschränken können. Allerdings zeigten eine Reihe verschiedener biophysikalischer Studien auch, dass hohe Drücke zur Verbesserung der Stabilität oder Erhöhung der Aktivität von Enzymen beitragen können.<sup>[19]</sup>

Auch für die Flora und Fauna haben die oben genannten Umweltfaktoren eine entscheidende Relevanz, da die Aufrechterhaltung der Stoffwechselaktivität und Lebensfähigkeit der Organismen meist nur in einem begrenzten Parameterraum möglich ist. Üblicherweise wird in der allgemeinen Biochemie suggeriert, dass normale physikalische Bedingungen, d. h. neutraler pH-Wert, Raumtemperatur, atmosphärischer Druck und aerobe Bedingungen in der gesamten Biosphäre die Norm bilden.<sup>[20]</sup> Ein genauerer Blick auf den Planeten Erde zeigt jedoch, dass der größte Teil des Biotops mit Wasser bedeckt ist und auch Temperaturen nahe oder unter dem Gefrierpunkt, Drücke bis zu 1100 bar und hohe Salzkonzentrationen vorherrschen können. Viele Tiefseeorganismen und Mikroorganismen trotzen diesen Gegebenheiten und sind in der Lage, unter diesen harschen Umweltbedingungen zu wachsen sowie sich zu reproduzieren.<sup>[20,21]</sup> Allerdings stellt sich hierbei die Frage, wie sich extremophile Organismen diesen Umweltbedingungen anpassen konnten und welche Auswirkungen extreme Bedingungen auf Organismen ausüben, die sie nicht tolerieren können. Zwei wesentliche Anpassungen gewährleisten die Funktion der Proteine unter erschwerten Umweltfaktoren auch weiterhin: Einerseits die intrinsische Anpassungen, bei denen sich Proteine über Veränderungen der Aminosäuresequenzen evolutionär entwickelt haben und welche die Stabilität, die Flexibilität und die Funktionalität in einem kleinen für den Organismus aber existenziellen Lebensraum sicherstellen. Andererseits die extrinsischen Anpassungen, bei denen andere Moleküle in Zellen die Aktivität und Stabilität von Proteinen aufrechterhalten.<sup>[21,22]</sup> Diese Klassen von niedermolekularen Verbindungen werden auch als Osmolyte (u. a. Piezolyte) bezeichnet, die in hohen Konzentrationen in den Zellen vorliegen, um den osmotischen Wasserverlust zu minimieren.<sup>[23,24]</sup> Zu diesen natürlich vorkommenden Osmolyten zählen Polyole, Kohlenhydrate, Methylamine, Aminosäurederivate und Harnstoff.<sup>[22]</sup> Das marine osmolytische Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) gilt dafür als Paradebeispiel und besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die den Umweltbedingungen entgegensteuert. TMAO strukturiert die Wasserschicht stärker und ist ferner vom Proteinrückgrat ausgeschlossen, wodurch die Proteinfaltung bzw. die Stabilität begünstigt wird.<sup>[25,26]</sup> Außerdem wirkt der Osmolyt dem destabilisierenden Effekten von Harnstoff, Druck und Temperatur

entgegen.<sup>[22,24]</sup> Hierzu wurde die Wirkung zweier verschiedener natürlich vorkommender Osmolytmischungen auf die Aktivität von  $\alpha$ -Chymotrypsin in Abhängigkeit des Drucks (Kapitel 3) untersucht.

Zusätzlich zu den Osmolyten ist das Innere der Zellen mit einer Vielzahl verschiedener löslicher Metaboliten und Makromolekülen (Proteine, Nukleinsäuren, Oligosaccharide) gefüllt, die ein hohes Gesamtvolumen im Cytosol (typischerweise 30 Vol.-%) ausmachen.<sup>[27,28]</sup> Hierbei liegt jedoch keine einzelne makromolekulare Spezies in hoher Konzentration vor. Jedes einzelne dieser gelösten Makromoleküle kann die Mobilität, Stabilität und Assoziationseigenschaft sowie Konformationsgleichgewichte, Transportprozesse und Reaktionsgeschwindigkeiten von Biomolekülen beeinflussen.<sup>[27,29,30]</sup> Bis zum heutigen Tag stellen Experimente zur Kinetik, in der die intrazelluläre Umgebung nachgeahmt wird, eine Ausnahme dar und werden in *in vitro* Studien weitgehend vernachlässigt. Um den Einfluss des makromolekularen *Crowdings in vitro* zu entschlüsseln, werden häufig synthetische Polymere, wie z. B. Dextran, Ficoll oder Polyethylenglykol, und leicht verfügbare Proteine (u. a. Chymotrypsin, Albumin, Lysozym) zur Nachahmung der intrazellulären Dichte der *Crowding*-Moleküle eingesetzt.<sup>[31,32]</sup> Kapitel 9 repräsentiert solch eine Studie und gibt einen Einblick in das Zusammenspiel der Effekte von synthetischen Polymeren, Cosolventien und Druck bei einer katalysierten Reaktion von  $\alpha$ -Chymotrypsin.

In zahlreichen biophysikalischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Verdrängungseffekt durch Makromoleküle nicht nur auf einen einzigen Mechanismus zurückgeführt werden kann. Im Allgemeinen werden die Wechselwirkungen zwischen einem Biomolekül und einem makromolekularen *Crowder* in enthalpische und entropische Beiträge unterteilt.<sup>[32]</sup> Zu den entropischen Beiträgen werden hauptsächlich die sterischen Abstoßungen zwischen den Molekülen gezählt, die ALLEN MINTON im Jahre 1981 als *excluded volume* Effekt beschrieb<sup>[33]</sup>, welcher in Abbildung 1-2 schematisch dargestellt ist. Zusätzlich zum Volumen, welches vom *Crowder*-Molekül eingenommen wird, hängt der *excluded volume* Effekt auch der Größe, Form und Konzentration des gelösten Moleküls ab.<sup>[31]</sup> Der enthalpische Effekt beinhaltet die chemischen Wechselwirkungen zwischen dem Biomolekül und dem makromolekularen *Crowder*, die sowohl attraktiv als auch repulsiv sein können. Attraktive, elektrostatische Interaktionen sowie hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen bewirken für gewöhnlich eine Bevorzugung des entfalteten Zustandes mit einer maximal lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*, SASA),<sup>[34]</sup> während repulsive Wechselwirkungen

die stabilisierende Wirkung des *excluded volume* Effekts verstärken und somit einen stabilisierenden Effekt auf den gefalteten Zustand haben.<sup>[35]</sup>

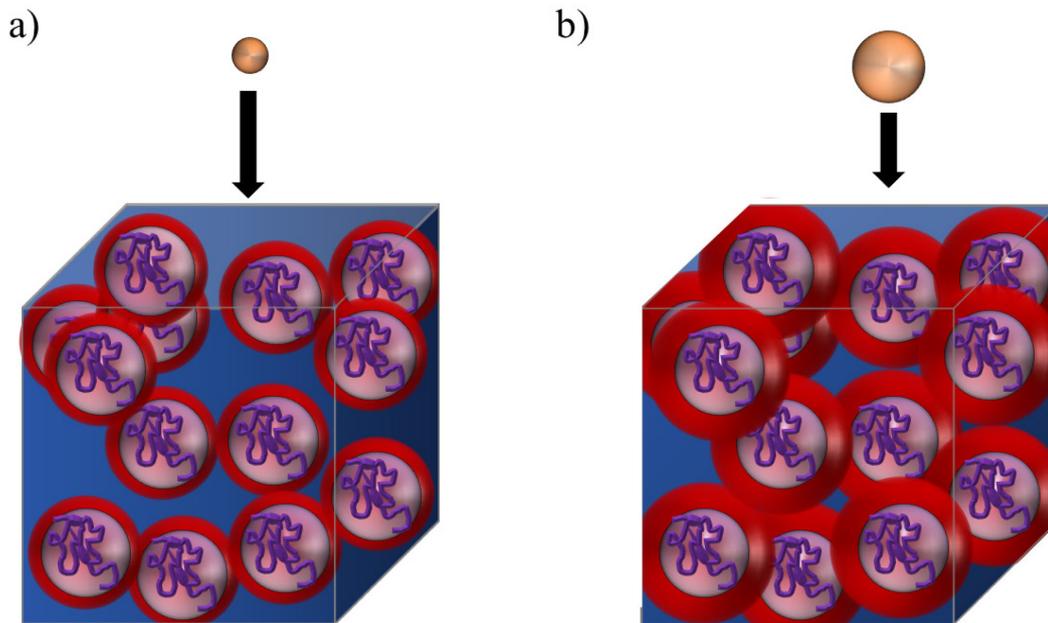


Abbildung 1-2: Schematisch illustriertes Konzept des *excluded volume* Effekts. Die makromolekularen *Crowder* (hier als ungeordnete Strukturen in violett gezeichnet) nehmen im Zellinneren (blau) typischerweise ~ 30 Vol.-% des verfügbaren Gesamtvolumens ein. a) Kleinere Moleküle (orange) können in einer makromolekularen Umgebung fast 70 Vol.-% des verbleibenden Gesamtvolumens einnehmen. b) Bei größeren Molekülen, ähnlich der Größe eines *Crowder*-Moleküls, ist das verfügbare Volumen jedoch deutlich kleiner und weniger Zwischenräume stehen zur Verfügung, da die bereits gelösten Moleküle einen beträchtlichen Raum einnehmen. Das ausgeschlossene Volumen ist hier in rot gekennzeichnet und entspricht in der Größe dem Radius des orangenen Moleküls (modifiziert aus Quelle<sup>[36]</sup>).

In Anwesenheit makromolekularer *Crowder*-Moleküle ist ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Faktor die resultierende erhöhte Lösungsmittelviskosität, die einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionskinetik biologischer Prozesse hat. Im Falle einer diffusionskontrollierten Reaktion nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund von Kollisionen mit den *Crowder*-Molekülen sowie gegenseitigen Wechselwirkungen ab.<sup>[37,38]</sup> Im reaktionskontrollierten Fall hingegen erhöhen die makromolekularen *Crowder* die effektive Konzentration und senken die Energiebarriere, wenn der Übergangszustand kompakter als der Grundzustand ist.<sup>[39]</sup>

## 1.2 Proteinstabilität

Eine weitere in dieser Arbeit untersuchte, wichtige Thematik ist der Entfaltungsprozess von Proteinen unter extremen Bedingungen. Die Denaturierung beschreibt den Vorgang der Entfaltung aus einer räumlich stabilen Anordnung des Proteins und kann einerseits durch chemische Einflüsse (pH-Wert, chemische Additive, Ionenstärke) sowie andererseits durch physikalische Bedingungen (Temperatur, Druck) induziert werden.<sup>[40]</sup> Aufgrund der individuellen Aminosäuresequenz und der spezifischen dreidimensionalen Struktur, welche durch nicht-kovalente Interaktionen, wie u. a. hydrophoben, elektrostatischen,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen und kovalente Interaktionen stabilisiert wird, besitzt jedes Protein eine bestimmte Stabilität. Im Falle eines Zweizustandsmodells gilt für den Entfaltungsprozess:

$$N(\text{nativer Zustand}) \rightleftharpoons D(\text{entfalteter Zustand}), K = [D] / [N] \quad 1-1$$

( $K$  = Gleichgewichtskonstante)

und für die Standard-Entfaltungs-GIBBS-Energie  $\Delta G_u^\circ$ :

$$\Delta G_u^\circ = G_D^\circ - G_N^\circ = -R \cdot T \cdot \ln(K) \quad 1-2$$

$$\Delta G_u^\circ = \Delta H_u^\circ - T \cdot \Delta S_u^\circ \quad 1-3$$

( $G_N^\circ/G_D^\circ$  = GIBBS-Energie im gefalteten / ungefalteten Zustand,  $R$  = universelle Gaskonstante,  $T$  = Temperatur,  $\Delta H_u^\circ$  = Standard-Entfaltungs-Enthalpie,  $\Delta S_u^\circ$  = Standard-Entfaltungs-Entropie)

Wenn das Protein im gefalteten Zustand und ungefalteten Zustand gleichermaßen vorliegt, beträgt die Gleichgewichtskonstante 1 und somit  $\Delta G_u^\circ = 0$ . Damit gilt für die Standard-Entfaltungs-Entropie  $\Delta S_u^\circ$ :

$$\Delta G_u^\circ = \Delta H_u^\circ - T \cdot \Delta S_u^\circ = 0 \Rightarrow \Delta S_u^\circ = \frac{\Delta H_u^\circ}{T} \quad 1-4$$

wobei  $T = T_u$  ist.

Die Temperatur- und Druckabhängigkeit von  $\Delta G$  ist für einen reversiblen Zwei-Zustands-Faltungs/-Entfaltungsprozess über folgende Beziehung zugänglich:

$$d\Delta G_u^\circ = \Delta V_u^\circ dp - \Delta S_u^\circ dT \quad 1-5$$

( $\Delta V_u^\circ$  = Volumenänderung,  $\Delta S_u^\circ$  = Entropieänderung)

Die Gleichgewichtskonstante  $K$  ist sowohl druck- als auch temperaturabhängig und mithilfe von Gleichung 1-5 lässt sich in Abhängigkeit der Temperatur bei konstantem Druck die VAN'T HOFFsche Enthalpieänderung  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$  ermitteln:

$$\left(\frac{\delta \ln K}{\delta T}\right)_{p = \text{konst.}} = \frac{\Delta H^\circ_{\text{vH}}}{RT^2} \quad 1-6$$

wobei in Abhängigkeit des Drucks bei konstanter Temperatur die Volumenänderung erhalten werden kann:

$$\left(\frac{\delta \ln K}{\delta p}\right)_{T = \text{konst.}} = -\frac{\Delta V_u^\circ}{RT} \quad 1-7$$

Bei einer Hitzedenaturierung wird eine Änderung der Sekundärstruktur des Proteins hauptsächlich durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen verursacht. Außerdem ist eine Abnahme des hydrophoben Effekts zu beobachten, da die hydrophoben Domänen bei einer Entfaltung für Wassermoleküle zugänglicher werden. Hierbei ist die treibende Kraft die Vergrößerung des entropischen Terms  $T \cdot \Delta S_u^\circ$ , wodurch die Entfaltung des Proteins energetisch favorisiert ist. Die Kältedenaturierung hingegen geht aus der Abnahme der Enthalpie hervor, da in dem Fall die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p^\circ$  aufgrund der Hydratisierung hydrophober Gruppen bei niedrigen Temperaturen positivere Werte annimmt.<sup>[15]</sup>

Drücke bis zu 3 kbar haben hauptsächlich Einfluss auf die Quartärstruktur des Proteins, während im Druckbereich oberhalb von etwa 4 kbar die Sekundär- und Tertiärstruktur beeinträchtigt wird. Wie bereits erwähnt, ist die treibende Kraft der druckinduzierten Entfaltung die Volumenverringerng.<sup>[14,18,41]</sup> Innerhalb der nativen Proteinstruktur gibt es kleine Hohlräume unterschiedlicher Größe und Form, die ein internes ausgeschlossenes Volumen für Lösungsmittelmoleküle bilden. Bei der druckabhängigen Entfaltung werden diese lösungsmittelfreien Hohlräume weitestgehend eliminiert, was zwangsläufig zu einer Verringerung des molaren Volumens des Gesamtsystems führt.<sup>[42]</sup> Eine mögliche Erklärung für die induzierte Dissoziation oligomerer Proteine bei Drücken von mehreren 1 kbar ist die unvollkommene Packung der Atome an der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten sowie die negative Volumenänderung, die durch das Aufbrechen von polaren und ionischen Bindungen in der Region zwischen den Untereinheiten resultiert.<sup>[41]</sup> Bei anschließender Dekompression können jedoch die resultierenden Monomere meist zum oligomeren Komplex reassoziieren.

Zur Visualisierung der Übergänge zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand bei Einwirkung von Stressfaktoren, wie u. a. Temperatur, Druck oder pH-Wert auf das Protein, werden

häufig Phasendiagramme erstellt. Ein solches Phasendiagramm (in Abhängigkeit des Drucks und der Temperatur) ist in Abbildung 1-3 beispielhaft dargestellt.<sup>[43]</sup>

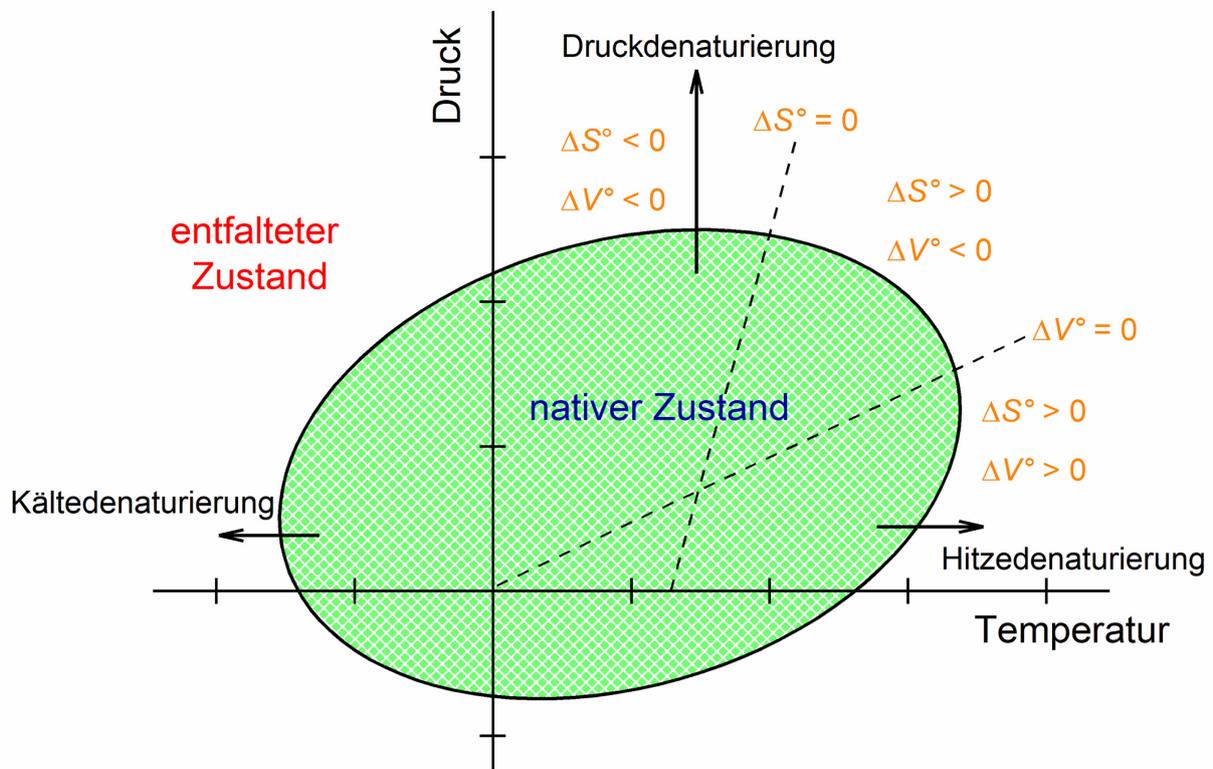


Abbildung 1-3: Allgemeines, schematisches Temperatur-Druck-Stabilitäts-Phasendiagramm unter Annahme eines Zweizustandsmodells für den Entfaltungsprozess eines Proteins mit den jeweiligen Vorzeichen der Entropie- und Volumenänderung (modifiziert aus Quelle<sup>[41]</sup>).

Für die korrekte Rückfaltung denaturierter Proteine sowie Unterstützung der nativen und funktionellen Konformation neu synthetisierter Proteine in biologischen Organismen dienen komplexe Faltungshelfermechanismen sogenannte Chaperone.<sup>[44]</sup> Dieser essentielle Prozess ist mit einem hohen Energieverbrauch verbunden. Des Weiteren wurde ein erhöhtes Expressionslevel der Chaperone bei Organismen, die nicht an extreme Umweltbedingungen angepasst sind, beobachtet.<sup>[45,46]</sup> In Kapitel 5 wird zu dieser Thematik die Stabilität des Chaperonin-Systems selbst unter extremen Bedingungen (hohe Temperaturen, hohe Drücke) in Anwesenheit von Cosolventien, Nukleotiden und Salzen untersucht.

Es stellt sich hierbei grundsätzlich die Frage, wie sich die Proteinstruktur und -stabilität eines Proteins eines mesophilen Organismus von einem Protein eines thermophilen Organismus unterscheidet. Hierzu wurde in Kapitel 6 die Druckstabilität des Arginin-Bindungsprotein

(ArgBP) von *Thermotoga maritima*, welches in der Nähe von hydrothermalen Schloten entdeckt wurde, untersucht und mit den temperatur- und druckinduzierten Entfaltungen anderer ausgewählter Proteine, die in einer Literaturübersicht aufgelistet sind, verglichen.

### 1.3 Astrobiologische Fragestellungen

Wie das Leben auf der Erde vor Jahrmilliarden entstanden ist und sich die ersten Organismen unter den damals herrschenden harschen Bedingungen, entwickeln konnten, ist der modernen Wissenschaft noch weiterhin ein Rätsel.<sup>[47]</sup> Das frühe Stadium der Erdoberfläche glich einer Apokalypse, da die Oberfläche mit aktiven Vulkanen übersät war, die giftige Gase und Gesteinsbrocken in die dünne Atmosphäre schleuderten. Darüber hinaus schlugen stellare Objekte (Meteoriten, Kometen) auf der Erdoberfläche ein, wodurch enorme Mengen an Energie und Staub freigesetzt wurden.<sup>[48]</sup> Wie soll unter diesen Umständen Leben auf der Oberfläche entstanden bzw. möglich gewesen sein?

Gerade die stellaren Objekte könnten eine wichtige Rolle für den Beginn des Lebens gespielt haben, indem sie als Transportmittel fungierten und organische Moleküle, Wasser und Vorläufermoleküle des Lebens (z. B. Methylamine) auf die Erde gebracht haben. Untersuchungen der Rosetta-Weltraummission aus dem Jahr 2014 zeigten, dass der Komet 67P/CHURYUMOV-GERASIMENKO Schlüsselbausteine des Lebens (z. B. Aminosäuren) enthält.<sup>[49]</sup> Vor etwa 3.5 Milliarden Jahren entstand auf der Erde der Urozean und der darin enthaltene Chemie-Cocktail bildete die Grundlage des heutigen Lebens. Ergebnisse aus dem UREY-MILLER-Experiment im Jahre 1953 suggerierten, dass die Produktion von Aminosäuren unter den vorherrschenden Erdbedingungen möglich war.<sup>[50]</sup> In Bezug auf die Entwicklung des ersten gemeinsamen Vorfahren allen Lebens stellt sich nun die Frage, wie sich aus einem abiotischen Vorrat an kleinen organischen Verbindungen komplexere Makromoleküle (u. a. Proteine, DNA) bis hin zu Zellen entwickeln konnten.<sup>[47]</sup> Hierzu wurden zwei Haupthypothesen formuliert, die *RNA world* und die *Protein world*, die beide einen plausiblen Lösungsansatz anbieten.<sup>[51]</sup> Jedoch weisen beide Theorien einige Diskrepanzen bezüglich der Aspekte der evolutionären Kontinuität, der Ubiquität der benötigten Bedingungen und der Robustheit des Modells ohne die Notwendigkeit wohl definierter Umweltparameter auf.<sup>[47,52,53]</sup> Aufgrund zahlreicher Studien über kurze Peptidmotive, die die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu assemblieren,<sup>[54]</sup> eine hohe Robustheit gegenüber äußeren Faktoren aufweisen,<sup>[55]</sup> Nukleotide mit hoher Spezifität zu binden<sup>[56]</sup> und Reaktionen zu katalysieren<sup>[57]</sup>, wurde eine weitere, ergänzende Hypothese hinsichtlich des Ur-

sprungs des Lebens aufgestellt, die *Amyloid world*.<sup>[58,59]</sup> Anhand dieser bemerkenswerten Fähigkeiten ist es denkbar, dass diese funktionell biologischen Einheiten während der Evolution proteinartiger Enzyme in der Tiefsee bei hohen Drücken eine wichtige Rolle eingenommen haben. In diesem Zusammenhang handelt die Studie in Kapitel 4 von der katalytischen Aktivität eines *de novo* konzipierten Polypeptids in Abhängigkeit des Drucks in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener Cosolventien und *Crowder*-Moleküle.

Wird die Biosphäre der Erde als ein biologischer Zoo angesehen, der von physikalischen und chemischen Extremen umzäunt ist, jenseits derer das Leben nicht mehr möglich ist (Abbildung 1-4), können diese Grenzen des Lebens durch Untersuchungen biologischer Prozesse unter extremsten Bedingungen gefunden werden,<sup>[60]</sup> um anhand derer die Bewohnbarkeit anderer planetarer Körper beurteilen zu können. Natürlich ist das Leben noch von vielen weiteren Faktoren abhängig, doch wenn die physikalischen und chemischen Bedingungen außerhalb der notwendigen Lebensbedingungen liegen, sind andere Kriterien hinsichtlich eines erdähnlichen, kohlenstoffbasierten Lebens irrelevant.<sup>[61]</sup>

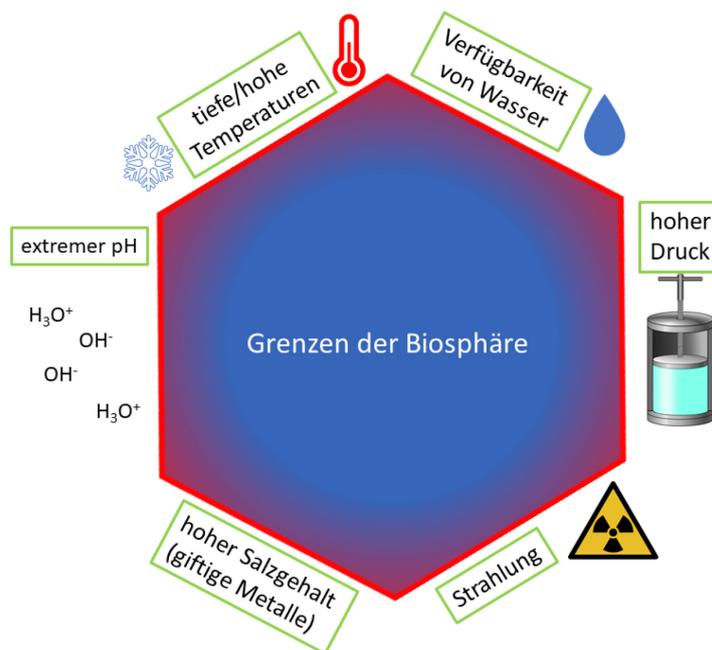


Abbildung 1-4: Vereinfachte schematische Darstellung der Grenzen der Biosphäre auf der Erde, die mögliches Leben eingrenzen. Bei Überschreitung der Grenze (rote Linie) ist das Überleben, die Stoffwechselaktivität oder die Fortpflanzung nicht mehr sichergestellt. Es gibt noch eine Reihe weiterer physikalischer und chemischer Extreme, die die Grenzen des Lebens definieren können, die hier jedoch nicht aufgetragen sind (modifiziert aus Quelle<sup>[61]</sup>).

Auf der Erde wurde eine Reihe von extremophilen Organismen aus Lebensräumen isoliert, die hohen hydrostatischen Drücken, Trockenheit, Strahlungen, erhöhten Temperaturen, extremen

pH-Werten, hohen Salzkonzentrationen und hohen Lösungsmittel-/Metallionenkonzentrationen ausgesetzt sind.<sup>[62]</sup> Können diese Organismen ein Indiz dafür sein, dass Leben auf anderen Himmelskörpern in unserem Sonnensystem, zwar nicht in demselben Ausmaß wie auf der Erde, aber dennoch möglich ist? Als mögliche Kandidaten für extraterrestrisches Leben gelten in der Astrobiologie unter anderem der Mars, einige Monde der Gasplaneten, der Asteroid Ceres sowie Exoplaneten, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

Die Suche nach dem Leben auf dem Mars fasziniert die Menschheit, angefangen von Künstlern und Schriftstellern bis hin zu den Wissenschaftlern, schon seit Jahrhunderten. Marsrover und Marssonden, die mit einer Reihe von wissenschaftlichen Instrumenten ausgestattet sind, erkunden derzeit die Marslandschaften atmosphärisch und geologisch nach spektralen Signaturen wichtiger Gase und Schlüsselbausteinen des Lebens. In der frühesten Geschichte des Planeten gibt es reichhaltige Hinweise auf die Existenz flüssigen Wassers. Zum Beispiel wurden anhand der Kartierung der Marsoberfläche Erosionsbereiche, vertrocknete Täler und Flussbetten entdeckt, die nur durch das Vorkommen flüssigen Wassers erklärt werden können.<sup>[61]</sup> Die Verfügbarkeit von flüssigem Wasser, die sich im Laufe der Zeit nach und nach einschränkte, wird auf die geringe Masse des Planeten, das Fehlen oder den Verlust eines globalen Magnetfeldes zum Schutz vor Sonneneinwirkungen, wie z. B. Sonnenwinden, und die dünne Atmosphäre zurückgeführt.<sup>[48]</sup> Unter derzeitigen Bedingungen von 6 mbar atmosphärischem Druck würde das flüssige Wasser auf der Oberfläche sofort verdampfen. Dennoch konnte H<sub>2</sub>O heutzutage in großen Mengen als Eis oder chemisch gebunden in manchen Mineralien auf dem Mars nachgewiesen werden.<sup>[61]</sup> Weiter haben Modellierungen wässrige Umgebungen in tieferen Schichten der Kryosphäre und der Marskruste, in denen Grundwasser existieren könnte, als mögliche Kandidaten für bewohnbare Umgebungen von Mikroorganismen vorgeschlagen. Im Jahre 2018 entdeckte die Raumsonde Mars Express Hinweise auf einen großen See unterhalb der permanenten, südpolaren Eiskappe des Planeten.<sup>[63,64]</sup> Allerdings herrschen unter der Eisdecke extrem tiefe Temperaturen, die durch die Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen kompensiert werden müssen, damit dennoch flüssiges Wasser vorliegt. OROSEI *et al.* vermuten an diesen Stellen hohe Konzentrationen an Perchloratsalzen, die den Gefrierpunkt von Wasser drastisch absenken können.<sup>[63]</sup> Perchloratsalze wirken jedoch stark oxidierend und haben schädliche Auswirkungen auf mikrobielles Leben.<sup>[65]</sup> Diese Tatsache senkt die Erwartungen, dass etwaige Lebensformen an diesen Orten möglich sind. Angesichts dessen wurde in einem Projekt dieser Arbeit der

kombinierte Effekt von marsrelevanten Salzen und hohem Druck, wie er unterhalb der Marsoberfläche herrscht, auf die enzymatische Aktivität und biomolekulare Stabilität des gut charakterisierten Enzyms  $\alpha$ -Chymotrypsin untersucht (Kapitel 7).

Aufgrund der Entdeckung unterirdischer Ozeane sind einige weitere Himmelskörper (Ganymed, Kallisto, Europa, Enceladus, und Ceres) in den Fokus der Astrobiologen geraten, da somit auf diesen möglicherweise Leben existieren kann.<sup>[66,67]</sup> In Hinblick auf die Exobiologie wurde in den letzten Jahren den Monden Europa, Enceladus und Titan die größte Aufmerksamkeit geschenkt, weil sowohl flüssiges Wasser als auch organische Verbindungen detektiert wurden. Titan zeichnet sich zudem durch eine dichte Atmosphäre, einen Methankreislauf (ähnlich dem Wasserkreislauf der Erde) und eine von flüssigen Kohlenwasserstoffen überschwemmte und stark veränderte Oberfläche aus.<sup>[61,66,68]</sup> Enceladus hingegen beherbergt höchstwahrscheinlich unter der Eiskruste einen Ozean mit hydrothermalen Quellen, was den prebiotischen Bedingungen im Urozean auf der Erde ähneln könnte.<sup>[61,69]</sup> Hierzu lieferte die Cassini-Mission weitere Indizien, da auf Enceladus Wasserfontänen beobachtet wurden, die komplexe organische Verbindungen in den Weltraum schleudern.<sup>[70,71]</sup>

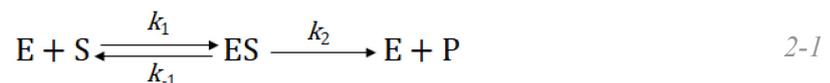
Um die Frage zu beantworten, ob das Leben auf der Erde einzigartig in unserer Milchstraße oder ein Regelfall ist, entwickelte der Astronom FRANK DRAKE im Jahre 1961 eine Gleichung, mit der er die Zahl der Zivilisationen in der Milchstraße voraussagen wollte. Da jedoch die meisten Faktoren in der Gleichung nicht präzise genug vorherzusagen sind, wird diese Gleichung eher als eine grobe Näherung angesehen. Die Entdeckung des ersten extrasolaren Planeten 51 Pegasi b<sup>[72]</sup> im Jahre 1995 durch MICHEL MAYOR und DIDIER QUELOZ (Nobelpreis für Physik 2019) steigerte das Interesse der Wissenschaft an dieser Fragestellung. Mithilfe verschiedener Detektionsmethoden wurden zunehmend immer mehr Exoplaneten verschiedenster Art (bezüglich Masse, Umlaufbahn, physikalischer und chemischer Zusammensetzung sowie weiterer Klassifikationen) entdeckt.<sup>[73]</sup> Dieser exponentielle Trend wird sich fortsetzen, da neue, weltraum- und bodengestützte Instrumente der nächsten Generation eingesetzt werden, welche den Himmel nach erdähnlichen Planeten oder nach Anzeichen von Leben durchforschten.<sup>[74]</sup>

## 2. Experimentelle Methoden

### 2.1 Hochdruck-Stopped-Flow-Methode

#### 2.1.1 Theoretische Grundlagen

Die quantitative Beschreibung der Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen erfolgt auf Basis des Modells von LEONOR MICHAELIS und MAUD MENTEN und dessen Erweiterung durch GEORGE BRIGGS und J. B. S. HALDANE. Dabei werden enzymatische Reaktionen durch die folgende vereinfachte Reaktionsgleichung (Gleichung 2.1) unter der Annahme beschrieben, dass die Substratkonzentration zu Beginn sehr hoch und die Produktkonzentration vernachlässigbar klein ist, sodass keine Rückreaktion zum Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt.<sup>[75]</sup> Dies spiegelt häufig Reaktionen in biologischen Systemen wider, bei der die Produktkonzentration aufgrund von Folgereaktionen des Produktes sehr niedrig ist:



( $k_1$  = Bildungsgeschwindigkeitskonstante,  $k_{-1}$  = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante,  $k_2$  = Geschwindigkeitskonstante)

Der erste Reaktionsschritt beschreibt die reversible Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES), ausgehend vom Enzym (E) und Substrat (S). Dabei stehen der Komplex und die unkomplexierten Biomoleküle im Gleichgewicht, welche durch die Bildungsgeschwindigkeitskonstante  $k_1$  und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  beschrieben werden. Anschließend reagiert der ES-Komplex irreversibel mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  zu dem Produkt (P) und dem Enzym. Die Produktbildung wird hier als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Gesamtreaktion angesehen. Folglich ist die Aktivierungs-GIBBS-Energie der Produktbildung größer als die der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Das erweiterte Modell von BRIGGS und HALDANE beinhaltet zusätzlich die Annahme, dass die zeitliche Änderung der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes während der *steady state*-Phase gleich null ist.<sup>[76]</sup> Somit gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit (MICHAELIS-MENTEN-Gleichung):

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_2 \cdot [E] \cdot [S]}{K_M + [S]}, \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad 2-2$$

( $v_{\max}$  = maximale Geschwindigkeit,  $K_M$  = MICHAELIS-Konstante,  $[S]$  = Substratkonzentration,  $[E]$  = gesamte Enzymkonzentration)

Aus dem MICHAELIS-MENTEN-Plot, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen die Substratkonzentration aufgetragen wird und einen hyperbolischen Verlauf annimmt, kann die MICHAELIS-Konstante  $K_M$  und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  ermittelt werden. Die MICHAELIS-Konstante  $K_M$  entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt. Des Weiteren ist  $K_M$  ein Maß für die Substrataffinität des Enzyms, die sich aus dem Verhältnis aus Dissoziation des ES-Komplexes zur Assoziation des Enzyms und Substrats ergibt. Bei einer sehr hohen Substratkonzentration liegen alle Enzyme gesättigt vor,  $K_M$  kann gegenüber  $[S]$  vernachlässigt werden und die Reaktionsgeschwindigkeit nähert sich einem Grenzwert ( $v_{\max}$ ) an. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf die Gesamtzymreaktion stellt die Wechselzahl  $k_2$  dar (Gleichung 2-3), die die Anzahl der Substratmoleküle bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat pro Zeiteinheit pro aktivem Zentrum angibt:<sup>[77]</sup>

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} v = k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[E]} \quad 2-3$$

( $k_{\text{cat}} = k_2 = \text{Wechselzahl}$ )

Zusätzlich kann die katalytische Effizienz  $k_{\text{eff}}$  des Enzyms über die Wechselzahl und die MICHAELIS-Konstante bestimmt werden:

$$k_{\text{eff}} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} \quad 2-4$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit kann auch in linearisierter Form in einem LINEWEAVER-BURK-Plot dargestellt werden:<sup>[78]</sup>

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max} \cdot [S]} \quad 2-5$$

Über die EYRING-Gleichung kann der Druckeffekt auf die Geschwindigkeit der Enzymreaktion beschrieben werden:<sup>[13,19]</sup>

$$\frac{d \ln(k/k_0)}{dp} = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad 2-6$$

( $p$  = Druck,  $T$  = Temperatur,  $R$  = universelle Gaskonstante,  $\Delta V^\ddagger$  = Aktivierungsvolumen,  $k_0$  = Geschwindigkeitskonstante bei einem Referenzdruck, in diesem Fall 1 bar)

Bei dem aus der Gleichung 2-6 erhaltenen Aktivierungsvolumen handelt es sich um die Differenz des partiell molaren Volumens des Übergangszustands ( $ES^\ddagger$ ) des Enzym-Substrat-Komplexes und des Grundzustands (ES) bzw. des Reaktandenzustands (E + S). Aufgrund der unterschiedlichen Kompressibilität der Reaktanden, des ES-Komplexes und des Übergangszustands können die  $\Delta V^\ddagger$  positiv oder negativ sein, sowie auch von der Druckamplitude abhängen. Im Rahmen des MICHAELIS-MENTEN-Formalismus gilt für hohe Substratkonzentrationen,  $k = k_{\text{cat}}$ , und für niedrige [S],  $k = k_{\text{cat}} K_M^{-1}$ . Somit beschreibt das Aktivierungsvolumen für große [S] den Unterschied zwischen den Volumina des Übergangszustands ( $ES^\ddagger$ ) und des ES-Komplexes,  $\Delta V^\ddagger = V_{ES^\ddagger} - V_{ES}$ . Bei niedrigen [S] hingegen bezieht sich die Volumenänderung auf den Unterschied zwischen den Volumina des Übergangszustands und der einzelnen Reaktanden,  $\Delta V^\ddagger = V_{ES^\ddagger} - V_{E+S}$ . Diesbezüglich können auch Informationen über die Volumenänderung bei der Bindung des Substrats an das Enzym erhalten werden.<sup>[79-81]</sup>

### 2.1.2 Experimentelles

Die Stopped-Flow-Methode ist ein geeignetes Verfahren, um schnelle chemische Prozesse, wie zum Beispiel Enzymreaktionen und Bindungsaffinitäten von Molekülen, unmittelbar nach dem Mischvorgang im Millisekunden (ms)- bis Sekunden (s)-Bereich zu untersuchen. Zur Analyse werden vorwiegend spektroskopische Methoden verwendet, die direkt mit der Stopped-Flow-Apparatur gekoppelt sind.

Für die vorliegende Arbeit wurden Enzymaktivitäten bei verschiedenen Drücken mit einem Hochdruck-Stopped-Flow-Instrument (HPSF-56, TgK Scientific) untersucht, welches Messungen bis zu 2 kbar erlaubt. Die wesentlichen Komponenten dieser Apparatur sind in Abbildung 2-1 aufgeführt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Stopped-Flow-Instrumenten besitzt dieses eine Hochdrucksteuereinheit, ein hochdruckresistentes Autoklavengefäß aus Edelstahl und einen pneumatischen Fahrmechanismus, der den Mischvorgang bewirkt, sowie durch Umpositionierung des pneumatischen Zylinders den Zugang zu den Autoklaven zum Einbringen der Messzelle ermöglicht. Die Druckvorrichtung setzt sich aus einem Flüssigkeitstank, zwei Pumpen, sowie fünf Ventilen zusammen, die durch Stahlkapillarröhrchen miteinander und mit dem unterseitigen Anschluss des Autoklavengefäß verbunden sind. Der Druck wird mit einem piezoelektrischen Manometer gemessen und als Hydraulikflüssigkeit wird destilliertes Wasser ver-

wendet. Unter Verwendung eines externen Umlaufwasserthermostats, welcher mit einem externen Thermosensor verbunden ist und sich in der Nähe der Messzelle befindet, konnte die gewünschte Temperatur eingestellt werden.

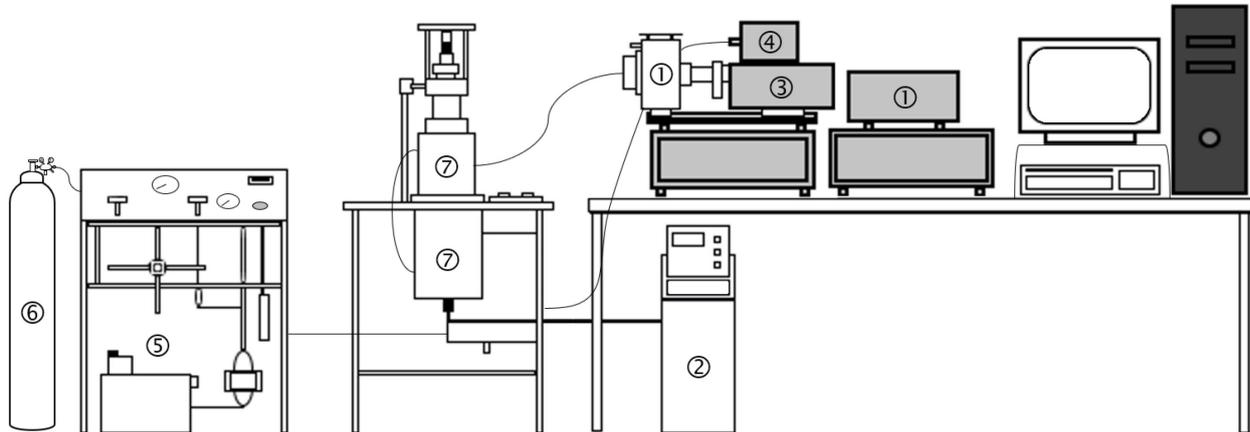


Abbildung 2-1: Wesentliche Komponenten des Hochdruck-Stopped-Flow-Instruments, modifiziert aus TgK Scientific (Benutzerhandbuch): ① Lichtquelle + Steuereinheit, ② Temperaturgesteuertes Wasserbad, ③ Monochromator zur Auswahl der gewünschten Lichtwellenlänge, ④ Photo diode array-Detektor, ⑤ Hochdruck-Hydraulikpumpe + Kontrolleinheit, ⑥ Gasflasche und ⑦ Hochdruckresistenter Autoklav + pneumatischer Fahrmechanismus.

Die Probenzelle des HPSF-Systems besteht aus zwei Reagenzspritzen, die an einen Auslaufbehälter angeschlossen sind. Eine der beiden Spritzen wird für die Enzymlyse verwendet, die andere für die Substratlösung. Diese Konstruktion bietet außerdem den Vorteil, dass Enzym und Substrat vor der Reaktion bereits unter Druck stehen können. Um den Durchfluss der Reagenzspritzen in den Autoklaven zu gewährleisten, werden mithilfe der Schubstange und eines pneumatischen Zylinders die beiden Reaktionszylinder nach unten gedrückt. Dieser Mechanismus bewirkt, dass gleiche Mengen beider Lösungen simultan zur Mischkammer und anschließend zur Observationszelle gelangen. Danach wird der Durchfluss im System durch den Auslaufbehälter gestoppt, worauf dieser ein Signal gibt, dass die Detektion gestartet werden kann und die Daten erfasst werden können (Abbildung 2-2). Die Totzeit des Instruments beträgt etwa 10 Millisekunden und das Totvolumen circa  $65 \mu\text{L}$ , während das Volumen in der Observationszelle  $40 \mu\text{L}$  entspricht. Weitere Details zur HPSF-56 können aus dem Benutzerhandbuch von TgK Scientific und aus der Referenz<sup>[82]</sup> entnommen werden.

Des Weiteren ist es möglich, sowohl Absorption als auch Fluoreszenz-Messungen in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 700 nm durchzuführen. Als Lichtquelle wird eine Quecksilber-Xenon-Lampe eingesetzt. Zur spektroskopischen Datenerfassung für Fluoreszenzmessungen passiert das Licht zunächst den Monochromator mit der gewünschten Wellenlänge. Über flexible Lichtleiter gelangt der Lichtstrahl zur Beobachtungszelle und anschließend zum Photomultiplier, der für die Fluoreszenzmessung mit einem geeigneten Sperrfilter ausgestattet ist. Für die Absorptionsmessungen wurde stattdessen ein *photo diode array* verwendet, welches eine schnelle Datenerfassung eines weiten Bereichs des Absorptionsspektrums erlaubt.

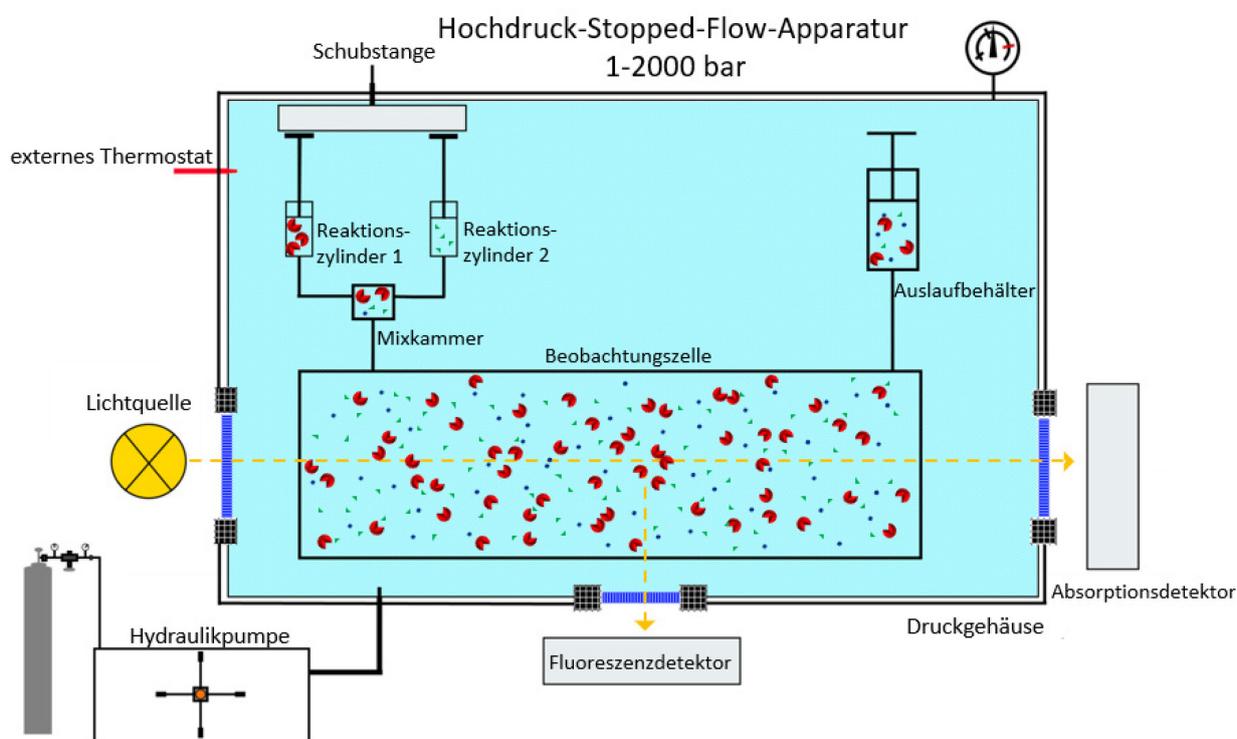


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Hochdruckzelle einer HPSF-Apparatur.

## 2.2 FOURIER-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

### 2.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Infrarotspektroskopie bietet die Möglichkeit, Struktur und Dynamik von Biomolekülen unter verschiedenen physikalischen Bedingungen und chemischen Einflüssen zu untersuchen, die wenig Zeit und Probenmengen erfordern. Im Gegensatz zur UV/Vis-Spektroskopie werden Molekülschwingungen in dem Wellenlängenbereich zwischen 800 und  $10^6$  nm angeregt und je nach Art des Moleküls bestimmte Frequenzbereiche absorbiert. Hierzu müssen die Frequenzen

von Licht und Schwingung miteinander übereinstimmen, um als charakteristisch zu gelten. Die Schwingung eines Moleküls wird ausschließlich als IR-aktiv betrachtet, wenn es über ein veränderbares oder ein induziertes Dipolmoment verfügt. Typischerweise werden IR-Spektren als Funktion der Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  dargestellt, die proportional zur Energie  $E$  ist:

$$E_{\nu} = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} \quad 2-7$$

( $c$  = Lichtgeschwindigkeit,  $\lambda$  = Wellenlänge,  $h$  = Planck'sches Wirkungsquantum,  $\nu$  = Frequenz,  $\tilde{\nu}$  = Wellenzahl)

Der harmonische Oszillator dient als physikalisches Modellsystem für die vereinfachte Veranschaulichung und Erläuterung der Schwingung eines Moleküls. Hierbei wird ein zweiatomiges Molekül mit den Massen  $m_1$  und  $m_2$  und einer Feder ohne Masse als Bindung dargestellt. Die Bindungsstärke zwischen den beiden Atomen wird durch die Kraftkonstante  $k$  charakterisiert. Eine Streckung oder Stauchung der Bindung bewirkt eine rückwirkende Kraft des Systems, welche die beiden Atome wieder in den Gleichgewichtsabstand bringen möchte (HOOKESche Gesetz). Für das zweiatomige Modell kann mit Hilfe der SCHRÖDINGER-Gleichung die Gesamtenergie des Systems, welche sich aus den Beiträgen der kinetischen und potenziellen Energie zusammensetzt, berechnet werden. Hierbei kann das Modell nur bestimmte Energieeigenwerte annehmen:

$$E_{\nu} = h \cdot \nu_0 \cdot \left( \nu + \frac{1}{2} \right) \text{ mit } \nu_0 = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad 2-8$$

( $\nu$  = Schwingungsquantenzahl,  $\nu_0$  = Eigenfrequenz des Oszillators,  $\mu$  = reduzierte Masse,  $k$  = Kraftkonstante, ein Maß für die Stärke der chemischen Bindung im Molekül).

Das Modell, bzw. die Potenzialkurve, des harmonischen Oszillators spiegelt jedoch nicht die molekularen Schwingungen realer Moleküle wider, da einerseits die Bindungsdissoziation bei Anregung in hohen Schwingungszuständen und andererseits die Abstoßung der Kerne bei zunehmender Annäherung nicht berücksichtigt werden. Im Modell des anharmonischen Oszillators wird dies miteinbezogen, um einen realeren Ansatz darzustellen. Weiterhin sind im Modell des anharmonischen Oszillators die Energieniveaus nicht mehr äquidistant und Obertöne der Schwingungen (Auswahlregel:  $\Delta\nu = \pm 1, \pm 2, \dots$ ) sind erlaubt.<sup>[83]</sup>

Das Schwingungsverhalten von mehratomigen Molekülen hängt von der Anzahl der Atome  $n$  und der Geometrie ab. Die Schwingungsformen können in zwei Gruppen unterteilt werden, die

Valenz-(Streck-)Schwingungen und Deformationsschwingungen. Schwingungen in Richtung der Bindungsachse repräsentieren die Valenzschwingungen (symmetrisch ( $\nu_s$ ) und asymmetrisch ( $\nu_{as}$ )), wohingegen die periodische Änderung des Bindungswinkels zu den Deformationsschwingungen ( $\delta$ ) zählt.<sup>[83]</sup>

### 2.2.2 Experimentelles

Moderne IR-Spektrometer, sogenannte FOURIER-Transform-Infrarot-Spektrometer, ermöglichen im Gegensatz zu dispersiven Geräten eine gleichzeitige Analyse des gesamten Frequenzbereiches. Diese Spektrometer gewähren kürzere Messzeiten und ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis. Weitere Vorteile gegenüber dispersiven Spektrometern sind einerseits die Detektion einer größeren Lichtmenge und einer damit verbundenen, höheren Empfindlichkeit (JACQUINOT-Vorteil), eine höhere Wellenzahlstabilität und -genauigkeit (CONNES-Vorteil) aufgrund des Helium-Neon-Lasers und dass der gesamte Wellenzahlenbereich zeitgleich gemessen werden kann (FELLGETT-Vorteil).

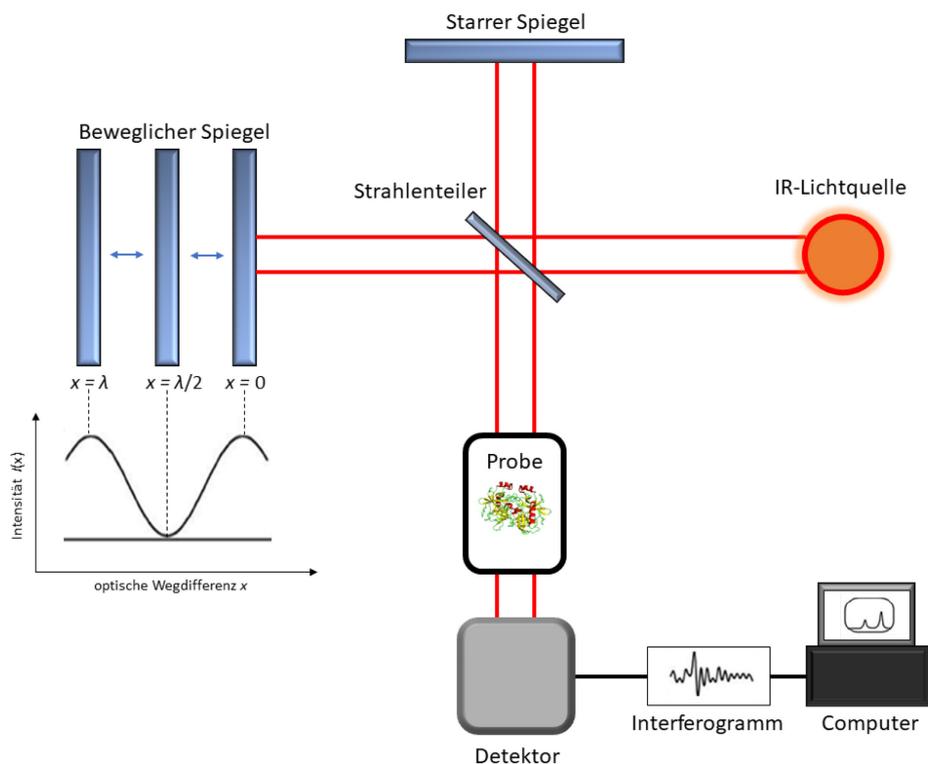


Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers mit anschließender FOURIER-Transformation, modifiziert nach Quelle<sup>[83]</sup>.

In Abbildung 2-3 ist ein typisches FTIR-Spektrometer schematisch dargestellt, dessen wesentlicher Bestandteil das MICHELSON-Interferometer ist. Die drei Hauptkomponenten des MICHELSON-Interferometers, beweglicher und starrer Spiegel sowie Strahlenteiler, besitzen eine spezifische Anordnung, die den zusammengeführten Strahlen erlauben, je nach Frequenz und Abstand zum Strahlenteiler, zu interferieren. Zunächst wird das infrarote Licht von der IR-Quelle zum halbdurchlässigen Strahlenteiler gesendet, der das Licht in zwei identische Teilstrahlen ( $\perp$  und  $\parallel$  zur Quelle) aufspaltet. Die Teilstrahlen werden vom beweglichen und starren Spiegel jeweils zum Strahlenteiler zurückreflektiert und ein Teil des resultierenden Strahls wird anschließend in den Probenraum und weiter zum Detektor gelenkt. Ist der Abstand, also die optische Wegdifferenz  $x$ , vom beweglichen und starren Spiegel zum Strahlenteiler gleich groß, überlagern die beiden Teilstrahlen konstruktiv am Strahlenteiler und die Intensität des Signals ist maximal. Ist  $x \neq 0$ , entsteht eine destruktive Interferenz, die zu einer verringerten Intensität führt. Hieraus resultiert das Interferogramm, welches den cosinusförmigen Intensitätsverlauf aus der Auftragung der Intensität  $I$  gegen die optische Wegdifferenz  $x$  widerspiegelt. Die spektralen Intensitäten werden aus dem Interferogramm, welcher FOURIER-transformiert wurde, erhalten, die die Zuordnung funktioneller Gruppen erlaubt:

$$A(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} F(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad 2-9$$

( $F(x)$ ): Interferogramm-Funktion,  $A(\tilde{\nu})$ : spektrale Intensität)

Im mittleren Infrarotbereich (200 bis 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) besitzen Proteine mehrere charakteristische Gruppenschwingungen, die durch die Schwingung des Polypeptidrückgrats verursacht werden (siehe Tabelle 2-1). Die räumliche Anordnung des Polypeptidrückgrats kann verschiedene Strukturen annehmen, die als Sekundärstrukturelemente bekannt sind. Mithilfe der FTIR-Spektroskopie ist es möglich, die Anteile der einzelnen Strukturelemente sowie die Sekundärstrukturzusammensetzung des Proteins näherungsweise zu ermitteln. In Hinblick auf die Sekundärstrukturanteile verfügt die Amid-I-Bande über das breiteste Informationsspektrum. Valenzschwingungen der C=O-Gruppe (70-85 %), sowie Streckschwingungen der C-N-Gruppe und Deformationsschwingungen der C-C-N-Gruppe tragen zu der Amid-I-Bande bei. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C=O- und N-H-Gruppen spielen bei der Sekundärstruktur eine wesentliche Rolle und bestimmen die Frequenzlage. Stärkere Wasserstoffbrückenbindun-

gen führen zu einer geringeren Elektronendichte der C=O-Bindung. Hierdurch wird die Kraftkonstante der Carbonylschwingung und folglich die Schwingungsfrequenz verkleinert. Somit ist aufgrund kleiner Variationen in der Molekülgeometrie und den Wasserstoffbrückenbindungsmustern eine Analyse der sekundären Strukturzusammensetzung und Konformationsänderung möglich.<sup>[84]</sup> Im Wellenzahlenbereich der Amid-I-Bande besitzt H<sub>2</sub>O aufgrund der H-O-H-Deformationsschwingung eine markante Absorptionsbande bei ca. 1640 cm<sup>-1</sup>. Um diese Bandenbeeinflussung zu verhindern, wird anstelle von Wasser (H<sub>2</sub>O) Deuteriumoxid (D<sub>2</sub>O) eingesetzt. Die Amid-I-Bande wird bei Verwendung des Lösungsmittels D<sub>2</sub>O mit einem Strich kenntlich gemacht (Amid-I'-Bande). In der Regel bestehen Proteine aus mehreren Sekundärstrukturelementen, die bei der Amid-I'-Bande nicht spektral aufgelöst sind. Um eine erhöhte Bandenauflösung der überlappenden Subbanden zu ermöglichen, müssen mathematische Verfahren und/oder Isotopensubstitution angewendet werden.

*Tabelle 2-1:* Zuordnung einiger relevanter IR-Banden von Proteinen und Peptiden in D<sub>2</sub>O. Wellenzahlen der Sekundärstrukturelemente sind als Richtwerte angegeben.<sup>[83,84]</sup>

Schwingungsbanden	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>
Amid-I'-Bande:	1700-1600:
intermolekulare $\beta$ -Faltblätter	1615-1625, 1680-1690
intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	1625-1640, 1670-1680
ungeordnete Strukturen	1640-1650
$\alpha$ -Helices	1650-1658
Schleifen	1660-1690
Amid-II'-Bande	1575-1480
Amid-III'-Bande	1330-1230
$\nu_s$ (CH <sub>3</sub> )	~ 2872
$\nu_{as}$ (CH <sub>3</sub> )	~ 2962
$\nu_s$ (CH <sub>2</sub> )	~ 2853
$\nu_{as}$ (CH <sub>2</sub> )	~ 2926

Zunächst wurden mithilfe der GRAMS/AI<sup>TM</sup>-Software 8.0 die gemessenen Spektren importiert, anschließend vom Puffer subtrahiert und geglättet (Grad der Glättung (60-70 %)). Im Wellenzahlbereich der Amid-I'-Bande wurden die FTIR-Spektren flächennormiert. Die *FOURIER-self-deconvolution* (FSD)-Methode bietet eine Möglichkeit, die systematische Abwandlung der Bandenform, die für die Überlappung der Subbanden verantwortlich ist, zu korrigieren. Aus dieser mathematischen Operation, die u. a. eine inverse FOURIER-Transformation beinhaltet,<sup>[85]</sup> resultiert ein Spektrum mit einer nachträglich reduzierten Halbwertsbreite der Subbanden, wo-

bei die relativen Intensitäten der einzelnen Absorptionsbanden erhalten bleiben. Allerdings können Artefakte (spektrales Rauschen), die beim FSD verstärkt werden, die Ergebnisse verfälschen. Dies kann verhindert werden, indem das Spektrum während der FSD-Prozedur mit einer Glättungsfunktion multipliziert wird.<sup>[85]</sup> Die zweite Ableitung der flächennormierten Amid-I'-Bande ermöglicht auch eine Erhöhung der Bandenauflösung, die jedoch quantitativ gesehen nur bedingt geeignet ist, da die relativen Intensitäten der Absorptionsbanden verzerrt werden.<sup>[86]</sup>

Die Ermittlung der Position und Anzahl der Subbanden erfolgt aus den Minima der zweiten Ableitung und den Maxima der FSD. Um die relativen, prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente zu bestimmen, wurde mittels linearkombinierter GAUß-LORENTZ-Funktion die Flächen der Subbanden (*Peak*) während des Anpassungsvorgangs (*curve fitting*) integriert (gesamte Amid- I'-Bandenfläche beträgt 100 %), wobei die Position jeder einzelnen Subbande mit einer Diskrepanz von  $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$  beziffert wurde.<sup>[87,88]</sup> Die Startparameter für den Anpassungsvorgang, wie Anzahl der Subbanden, Position, Höhe und Halbwertsbreite des Peaks, wurden mit in der Literatur gängigen Grenzen (z. B. Position:  $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ , Höhe:  $> 0$ , Halbwertsbreite:  $< 22 \text{ cm}^{-1}$ ) versehen.<sup>[89]</sup> Hier werden jedoch nur die relativen Änderungen der Sekundärstrukturelemente betrachtet, wobei angenommen wird, dass die Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Sekundärstrukturelemente gleich sowie temperatur- und druckunabhängig sind.<sup>[90]</sup>

Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei dem Prozess der Entfaltung oder Dissoziation des Proteins in Abhängigkeit der Temperatur oder des Drucks um ein Zwei-Zustandsmodell handelt, kann die BOLTZMANN-Funktion verwendet werden. Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve liefert die Entfaltungstemperatur ( $T_u$ ) bzw. den Entfaltungsdruck ( $p_u$ ). Darüber hinaus können aus den experimentellen Daten die thermodynamischen Parameter (VAN'T HOFF-Enthalpie,  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ , respektive die Volumenänderung,  $\Delta V_u^\circ$ ) bestimmt werden:

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-\left(\frac{1}{T_u} - \frac{1}{T}\right) \frac{\Delta H^\circ_{\text{vH}}}{R}}} + I_u \quad 2-10$$

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-(p-p_u) \frac{\Delta V_u^\circ}{RT}}} + I_u \quad 2-11$$

( $T$  = Temperatur in Kelvin,  $R$  = universelle Gaskonstante,  $I_f$  = Plateauwert der Intensität im gefalteten Zustand,  $I_u$  = Plateauwert der Intensität im entfalteten Zustand)

Die temperaturabhängigen FTIR-Spektren wurden mithilfe des Nicolet 5700 FTIR-Spektrometers in einem Wellenzahlbereich von 4000 bis  $1100\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen, das mit einem flüssigstickstoffgekühlten MCT-Detektor (HgCdTe) ausgestattet ist. Ein Probenvolumen von ungefähr  $15\text{ }\mu\text{L}$  wurde in das zweiteilige Stahlgehäuse zwischen zwei  $\text{CaF}_2$ -Fenstern platziert, die durch eine Mylar-Folie mit einer Dicke von  $50\text{ }\mu\text{m}$  getrennt sind (Abbildung 2-4). Ein externer Umlaufwasserthermostat in Anwesenheit eines externen Thermosensors regelte die erforderliche Temperatur der Zelle mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$ . Um sicherzustellen, dass die Probe äquilibriert war, wurde jede Temperatur  $\sim 10$  Minuten lang aufrechterhalten, bevor die Spektren aufgenommen wurden. Druckabhängige FTIR-Messungen wurden unter Verwendung eines Magna IR-550 in einem Wellenzahlbereich von 4000 bis  $650\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt, welches ebenfalls mit einem flüssigstickstoffgekühlten MCT-Detektor (HgCdTe) ausgestattet ist. Zum Erreichen von Drücken bis zu 12 kbar (1.2 GPa) wurde eine membranbetriebene Diamantstempelzelle (Diacell® VivoDac, Almax easyLab), die an einem automatisierten, pneumatischen Druckregler angeschlossen war, verwendet. Eine  $50\text{ }\mu\text{m}$  dicke Messingdichtung mit einer Bohrung von  $0.45\text{ mm}$  diente als Platzhalter zwischen den beiden Diamanten (effektives Probenvolumen  $9.8\text{ nL}$ ) (Abbildung 2-4). Unter Verwendung der druckabhängigen, symmetrischen Streckschwingung von  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $983.5\text{ cm}^{-1}$  bei 1 bar) wurde  $\text{BaSO}_4$  als interner Druckkalibrator eingesetzt.<sup>[91,92]</sup>

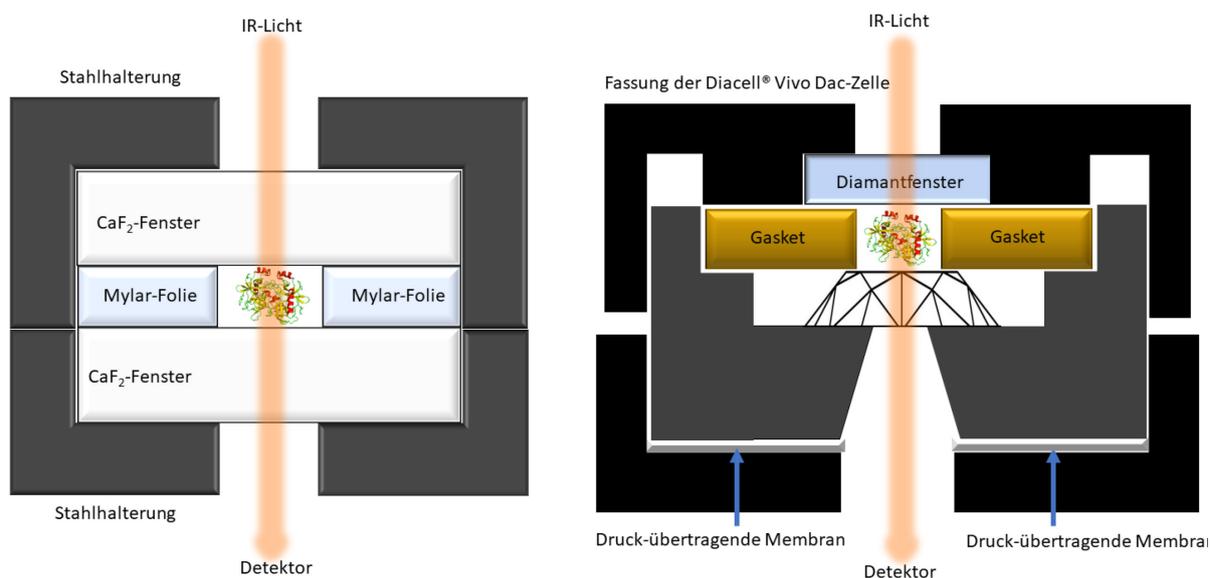


Abbildung 2-4: Schematische Querschnittsdarstellung der verwendeten IR-Zellen (links: temperierbare Messzelle und rechts Diacell® VivoDac-Zelle).

Für alle FTIR-Experimente wurde eine Proteinkonzentration von 20 bis 60 mg mL<sup>-1</sup> gewählt. Um Störungen durch CO<sub>2</sub> und Feuchtigkeit zu vermeiden, wurde die Probenkammer kontinuierlich mit CO<sub>2</sub>-freier und trockener Luft gespült. Nach dem Einsetzen der Probe in die Zelle betrug die Wartezeit etwa 30 Minuten, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Jedes Spektrum (bei Variation des Drucks oder der Temperatur) wurde mit der Spektralverarbeitungs-Software Omnic 7.2 über 128 Scans in Folge pro Messung gemittelt und durch eine HANN-GENZEL-Funktion apodisiert. Die Auflösung wurde auf 2 cm<sup>-1</sup> eingestellt.

### **3. Einfluss von Glycin, TMAO und Osmolytgemischen auf die druckabhängige katalytische Aktivität von $\alpha$ -Chymotrypsin**

#### 3.1 Einleitung

Das Leben unter extremen Umweltbedingungen, wie zum Beispiel bei hoher oder niedriger Temperatur, hohem Druck, Trockenheit, hohem Salzgehalt und extremem pH-Wert, erfordert ein hohes Maß an Anpassung.<sup>[93,94]</sup> Beispielshalber sind Tiefseeorganismen hydrostatischen Drücken von bis zu 1100 bar (110 MPa) ausgesetzt.<sup>[22]</sup> Die Mechanismen, mit denen sich Organismen an solch feindliche Umweltbedingungen anpassen, sind noch weitgehend unbekannt. Eine der vorgeschlagenen Strategien beinhaltet die Ansammlung von schützenden Osmolyten im Cytosol.<sup>[22,23,94,95]</sup> In der Vergangenheit wurden hauptsächlich der stabilisierende Effekt und die Wirkungsweise einzelner Cosolute auf die Proteinstabilität untersucht, welche inzwischen relativ gut verstanden sind.<sup>[94]</sup> Allerdings kommen *in vivo* Osmolyte in der Regel in komplexen Gemischen mit variabler Zusammensetzung vor, die von den besonderen Umweltbedingungen des Organismus abhängen.<sup>[22,23,95]</sup>

In den letzten Jahren hat das Interesse an Untersuchungen der Druckabhängigkeit biomolekularer Systeme, wie zum Beispiel der Stabilität von Proteinen, deutlich zugenommen.<sup>[16,41,104-107,96-103]</sup> Ein weiteres, wachsendes Forschungsfeld beschäftigt sich mit der Verwendung der Druckvariable in Bezug auf die Aktivität von Enzymen.<sup>[19,55,108-112]</sup> Die kombinierten Auswirkungen von Temperatur, Druck und Osmolyten auf die Enzymaktivität sind jedoch weitgehend unerforscht, obwohl diese nicht nur dem Verständnis der Physiologie von Tiefseeorganismen dienen, sondern auch der Verbesserung biotechnologischer Anwendungen.

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von zwei verschiedenen Osmolytmischungen, die in Flachwassergarnelen (*shrimp shallow*-Gemisch) und in Tiefseegarnelen (*deep sea*-Gemisch) vorkommen<sup>[23]</sup>, sowie deren Hauptkomponenten auf die enzymatische Aktivität eines ubiquitären und gut charakterisierten Enzyms,  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -CT), untersucht. Das *shrimp shallow*-Gemisch wurde in Garnelen gefunden, welche etwa 500 Meter unterhalb des Meeresspiegels leben, das *deep sea*-Gemisch hingegen bei Tiefseeorganismen in 2900 Metern Meerestiefe.<sup>[23]</sup> Wie in Abbildung 3-1 gezeigt, stechen die Osmolyte Glycin und Trimethylamin-N-oxid (TMAO) in den Zusammensetzungen heraus. Valin wurde als zusätzliche Komponente in den Osmolytmischungen hinzugefügt, da es keine signifikante stabilisierende Wirkung auf Proteine hat, aber in der Lage ist, eine bevorzugte Hydratisierung von Proteinen zu induzieren.<sup>[113]</sup>

Bemerkenswerterweise fanden YANCEY *et al.* für TMAO heraus, dass dieses kosmotrope und proteinstabilisierende Additiv in Fischen und anderen Taxa bekanntermaßen mit der Meerestiefe als Anpassung an den extrinsischen Druck bei Tiefsee-relevanten Temperaturen zunimmt.<sup>[22]</sup> Es wird angenommen, dass seine Wirkung größtenteils auf den Volumenausschlusseffekt (*excluded volume* Effekt) zurückzuführen ist, d. h. das Protein wird bevorzugt hydratisiert, wodurch das Faltungsgleichgewicht des Proteins auf die Seite des gefalteten Zustandes verschoben wird, welche eine kompakte Konformation mit einer minimalen lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (SASA) aufweist.<sup>[94,114]</sup>

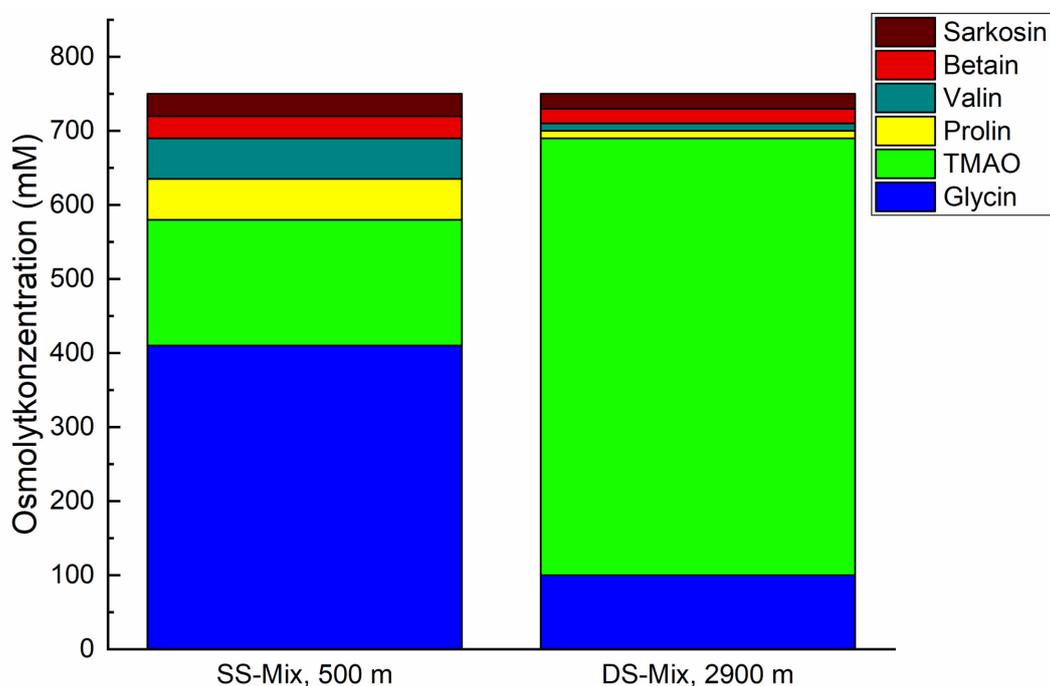


Abbildung 3-1: Zusammensetzung des *shrimp shallow* (SS)- und *deep sea* (DS) Osmolyt-Gemisches, die in den Garnelen in Meerestiefen von circa 500 Metern, beziehungsweise in der Tiefseeebene bei 2900 Metern vorkommen (modifiziert aus YANCEY *et al.*, 2002).<sup>[23]</sup>

Im Allgemeinen entfalten Proteine bei hohen hydrostatischen Drücken (typischerweise zwischen 2000 und 8000 bar,  $\alpha$ -CT etwa bei 5 kbar bei Raumtemperatur<sup>[41]</sup>), da der entfaltete Zustand im Vergleich zum nativen Zustand ein geringeres Volumen besitzt, welches im Wesentlichen auf die unvollkommene Packung der Aminosäuren im gefalteten Zustand zurückzuführen ist.<sup>[41,94,100]</sup> Demzufolge sollten enzymatische Untersuchungen bei Drücken unterhalb des Entfaltungsdrucks des Enzyms durchgeführt werden.

$\alpha$ -Chymotrypsin ist eine Serinprotease, die Peptidbindungen spaltet, insbesondere solche, die eine hydrophobe, aromatische Aminosäure (Tyr, Trp, Phe) enthalten. Diese Aminosäuren verfügen über einen aromatischen Ring in ihrer Seitenkette, der mit dem katalytisch aktiven Zentrum des Enzyms interagiert.<sup>[115]</sup> Es ist bekannt, dass die katalytische Aktivität von  $\alpha$ -CT in Lösung durch Druck verbessert wird, d. h. das Aktivierungsvolumen der Reaktion ist negativ, was zeigt, dass der Übergangszustand des Enzym-Substrate-Komplex,  $ES^\ddagger$ , dichter gepackt ist und ein kleineres Hohlraumvolumen besitzt.<sup>[19,79,116–118]</sup>

Um enzymatische Reaktionen ohne größere Schwierigkeiten auf kurzen Zeitskalen zu verfolgen, hat sich die Hochdruck-Stopped-Flow-Apparatur als leistungsfähige Methode erwiesen.<sup>[111]</sup> Hier wurde zusätzlich die Auswirkung verschiedener Arten von Osmolyten, einschließlich der im *shrimp shallow*- und *deep sea*-Gemisch, vorhandenen, auf die enzymatische Aktivität von  $\alpha$ -CT untersucht. Während sich einiges an Wissen über den Einfluss von TMAO, hauptsächlich im DS-Mix vorhanden, und anderen Cosolventien auf die Proteinstabilität und -funktion bei Umgebungsbedingungen angesammelt hat,<sup>[119–125]</sup> ist nur wenig über die Auswirkung von TMAO und freien Aminosäuren, wie Glycin, der Hauptkomponente im SS-Mix, auf die Druckabhängigkeit der enzymatischen Aktivität bekannt. Der Schwerpunkt dieses Projekts liegt nicht auf der Untersuchung der tiefseebezogenen Druckanpassung, da keine Daten über tiefseeangepasste Enzyme und niedrigere Temperaturen erhoben wurden, sondern auf der Erhebung quantitativer kinetischer und volumetrischer Daten über die kombinierten Auswirkungen von Druck und natürlichen Osmolyten sowie deren Mischungen mittels modernster Hochdrucktechnologie, um synergetische oder gegenläufige Effekte zu ermitteln.

### 3.2 Probenpräparation

Die erworbenen Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für die kinetischen Studien an der Hochdruck-Stopped-Flow-Apparatur wurde Tris(tris(hydroxymethyl)aminomethan)-HCl (Tris) als Puffer verwendet, welches eine geringe Druckempfindlichkeit auf den pH-Wert aufweist.<sup>[126]</sup> Fünf Pufferlösungen wurden bei einem pH-Wert von 7.7 mit unterschiedlichem Osmolytgehalt hergestellt: reiner Puffer ohne Osmolyte, Puffer unter Zugabe von 410 mM Glycin, 170 mM TMAO, 55 mM Prolin, 55 mM Valin, 30 mM Sarkosin, 30 mM Betain (*shrimp shallow*-Gemisch = SS-Mix), Puffer unter Zugabe von 100 mM Glycin, 590 mM TMAO, 10 mM Prolin, 10 mM Valin, 20 mM Sarkosin, 20 mM Betain (*deep sea*-Gemisch = DS-Mix<sup>[23]</sup>), und zwei Pufferlösungen, die entweder 1 M Glycin oder 1 M TMAO

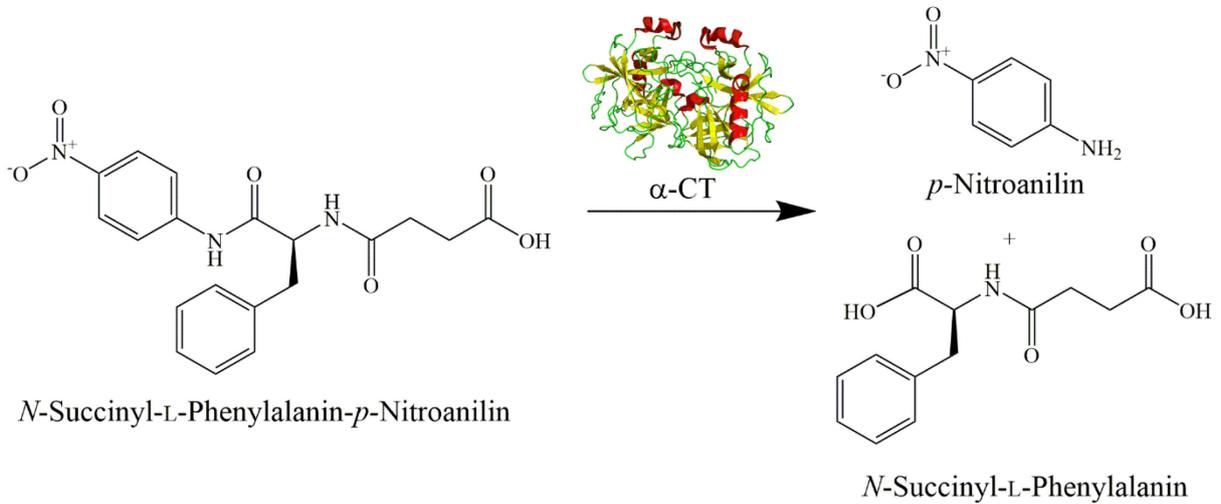
enthielten. Sowohl das Enzym  $\alpha$ -Chymotrypsin als auch das Substrat *N*-Succinyl-L-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid (SP*p*NA) wurden in den jeweiligen Pufferlösungen gelöst. Für jede Messreihe betrug die Anfangskonzentration des Enzyms 16  $\mu$ M bevor das Enzym in die Probenzelle gefüllt wurde. Durch Mischen mit der Substratlösung wurde die Enzymkonzentration halbiert. Für das Substrat wurden fünf verschiedene Konzentrationen zwischen 0.2 mM und 8 mM (0.1 mM bis 4 mM nach dem Mischen mit der Enzymlösung) verwendet.

Mit Hilfe des HPSF-Instruments wurde die Enzymaktivitäten bei verschiedenen Drücken bis maximal 2 kbar vermessen.<sup>[82,127,128]</sup> Der Druck wurde dabei mittels einer Hochdruckkontrollleinheit gesteuert. Nachdem der gewünschte Druck erreicht war, wurden die Proben 5 Minuten lang äquilibriert. Anschließend wurde nach dem Schnellmischvorgang die Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm für 200 Sekunden gemessen. Die Temperatur der Messzelle wurde mit einem externen Umlaufwasserthermostat auf 20 °C reguliert, welcher mit einem externen Thermosensor verbunden ist.

Obwohl  $\alpha$ -CT bei höheren Temperaturen eine höhere Effizienz aufweist, wurde diese Temperatur gewählt, um genauere kinetische Daten in einem geeigneten Zeitfenster zu erhalten und um diese Daten mit vorherigen biophysikalischen Studien an diesem Enzym vergleichen zu können.<sup>[79,109]</sup> Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizientens,  $\epsilon_{410 \text{ nm}} = 8750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,<sup>[129]</sup> und der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm konnte die Konzentration des Produktes *p*-Nitroanilin berechnet werden. Diese Wellenlänge wurde gewählt, um die Bildung des Produkts ohne Beeinflussung der Absorption des Substrats zeitlich zu verfolgen (Abbildung 3-2b). Origin 9.3 (OriginLab) diente zur Verarbeitung der Daten.

3.2 Probenpräparation

a)



b)

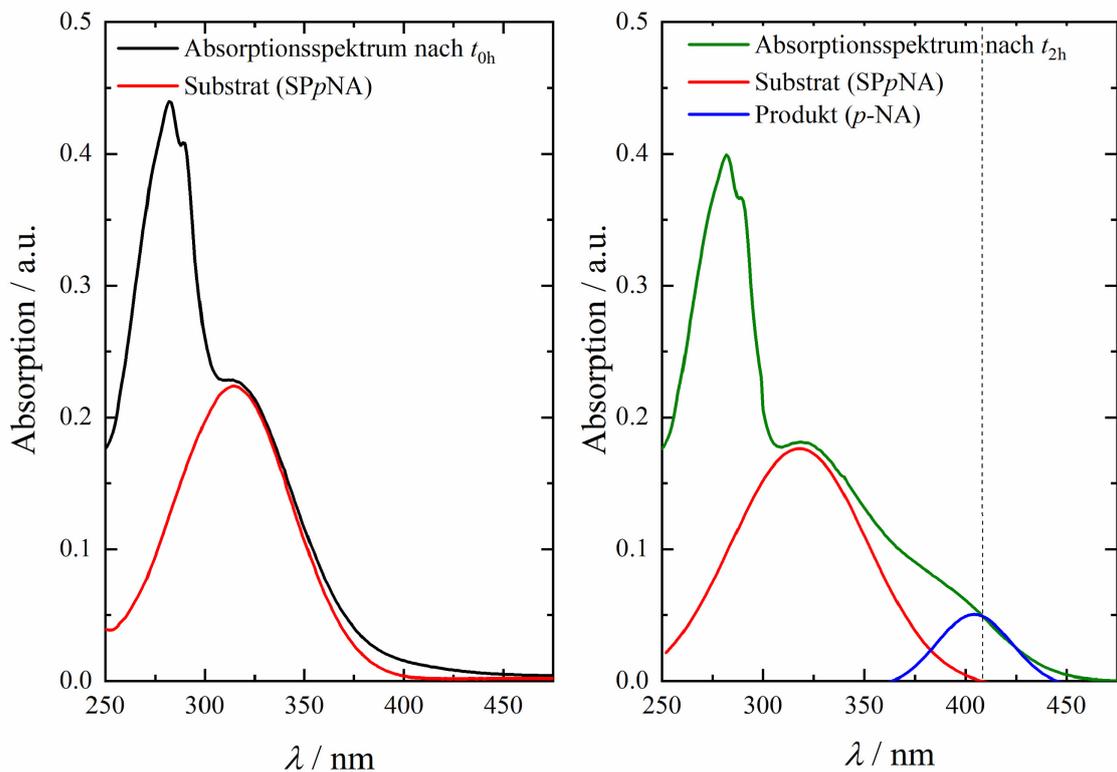


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Reaktionsgleichung und gemessene zeitliche Änderung des Absorptionsspektrums während der Reaktion. a) Reaktionsgleichung der Hydrolyse von *N*-Succinyl-L-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid zu *p*-Nitroanilin und *N*-Succinyl-L-Phenylalanin durch das Enzym  $\alpha$ -Chymotrypsin (PDB: 1YPH). b) Absorptionsspektrum der Komponenten im Reaktionssystem (Substrat = rot, Produkt = blau) zu Beginn ( $t_{0h}$ ) und nach zwei Stunden ( $t_{2h}$ ). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 410 nm verfolgt, um die Bildung des Produkts zeitabhängig bestimmen zu können.

### 3.3 Ergebnisse und Diskussion

Für die Ermittlung der kinetischen Parameter der Enzymreaktion wurde die Aktivität in Abhängigkeit folgender Substratkonzentrationen,  $[S] = 0.1, 0.25, 0.75, 2.0, 4.0$  mM, gemessen. Abbildung 3-3a veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der UV/Vis-Absorption bei 410 nm, der die Bildung des Produkts *p*-Nitroanilin widerspiegelt. Hier ist die Katalyse von SPpNA durch  $\alpha$ -Chymotrypsin im *shrimp shallow*-Gemisch bei 20 °C bei Umgebungsdruck dargestellt. Es zeigte sich, dass die Produktbildung bei allen Substratkonzentrationen während des aufgezeichneten Zeitverlaufs linear ansteigt. Das kinetische Verhältnis  $v_0/[E]$  nimmt bis zu einer Substratkonzentration von etwa 2 mM zu und erreicht bei höheren Konzentrationen einen Plateau-Wert (Abbildung 3-4).

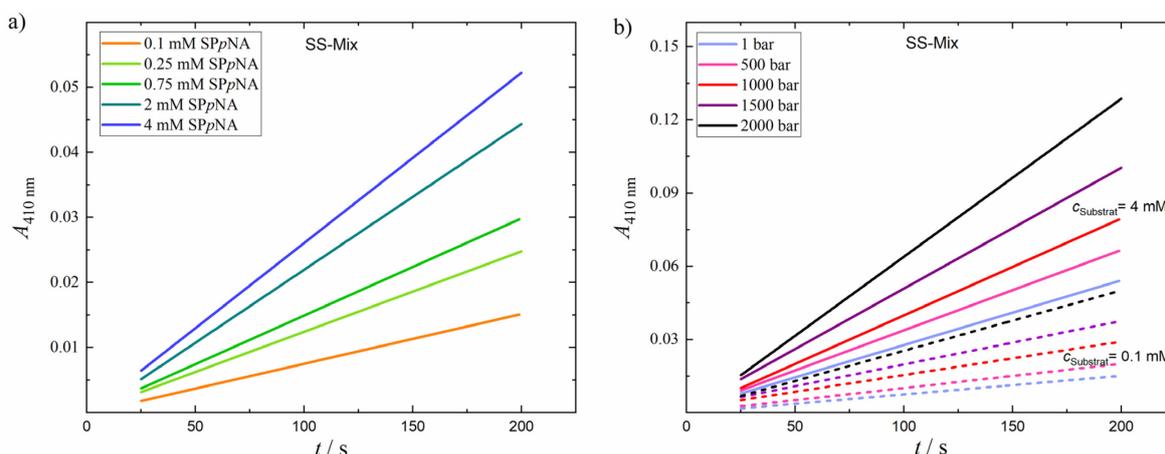


Abbildung 3-3: Auftragung der Konzentration des gebildeten Produktes in Abhängigkeit der Zeit, hier exemplarisch dargestellt für die Hydrolyse von SPpNA durch  $\alpha$ -CT im SS-Mix bei 20 °C. a) Bei fünf Substratkonzentrationen,  $c_{\text{Substrat}}$ , im Bereich von 0.1 mM bis 4 mM bei Umgebungsdruck, b) bei fünf verschiedenen Drücken (1, 500, 1000, 1500 und 2000 bar) für die niedrigste (gestrichelte Linie) und höchste (durchgezogene Linie) verwendete Substratkonzentration.

Abbildung 3-3b beschreibt die Absorptionsänderung bei 410 nm für fünf verschiedene Drücke (1, 500, 1000, 1500, 2000 bar) bei der niedrigsten und höchsten Substratkonzentration,  $[S]$ , d. h. bei 0.1 und 4.0 mM, für die Hydrolyse von SPpNA durch  $\alpha$ -CT im *shrimp shallow*-Gemisch bei 20 °C. Die Steigung von  $A_{410\text{ nm}}(t)$  nimmt mit zunehmendem hydrostatischen Druck für beide Substratkonzentrationen zu. Dies deutet auf eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch ein negatives Aktivierungsvolumen hin, welches in Übereinstimmung mit den Literaturdaten von MOZHAEV *et al.* steht.<sup>[109]</sup> Untersuchungen mit anderen Substraten (Ala-Ala-Phe-7-

3.3 Ergebnisse und Diskussion

amido-4-methylcoumarin oder SAAP<sub>p</sub>NA) zeigten einen ähnlichen Druckeffekt für diese Art von Reaktion.<sup>[79,130]</sup>

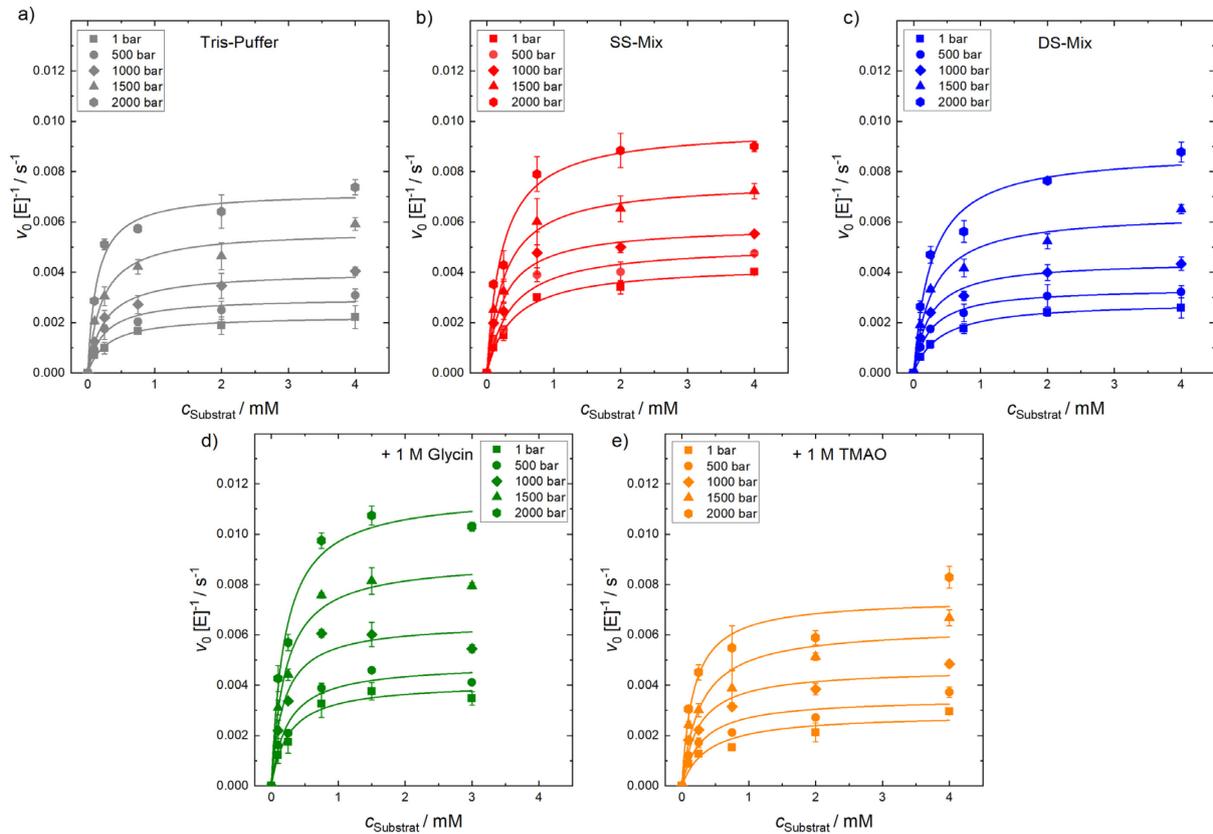


Abbildung 3-4: MICHAELIS-MENTEN-Plots der enzymatischen Aktivität von  $\alpha$ -CT bei verschiedenen Substratkonzentrationen,  $c_{\text{Substrat}}$ , und Drücken,  $p$ . a) Tris-Puffer ohne Osmolyte (grau), b) *shrimp shallow*-Gemisch, (SS-Mix, rot), c) *deep sea*-Gemisch, (DS-Mix, blau), d) Tris-Puffer in Anwesenheit von 1 M Glycin (grün) und e) Tris-Puffer in Anwesenheit von 1 M TMAO (orange).

Abbildung 3-4 stellt die MICHAELIS-MENTEN-Diagramme für die fünf hydrostatischen Drücke dar. Alle Proben folgen der zu erwarteten Enzymkinetik nach MICHAELIS-MENTEN und die maximale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion,  $v_{\text{max}}$ , steigt mit zunehmendem Druck. Beim Vergleich der MICHAELIS-MENTEN-Kurven des *shrimp shallow*-Gemisches mit der Enzymreaktion im Tris-Puffer und *deep sea*-Gemisch ist zu erkennen, dass  $v_{\text{max}}$  im *shrimp shallow*-Gemisch größere Werte aufweist als in den beiden anderen Fällen. Um zu untersuchen, welche der Komponenten der Puffermischung für diesen Effekt verantwortlich ist, wurde die Enzymaktivität im Tris-Puffer in Anwesenheit der beiden Hauptkomponenten der beiden na-

türlich vorkommenden Osmolyt-Gemische, TMAO und Glycin, gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass 1 M Glycin einen drastischen Effekt auf  $v_{\max}$  hat, während 1 M TMAO keinen oder einen vernachlässigbaren Einfluss auf die kinetischen Parameter hat.

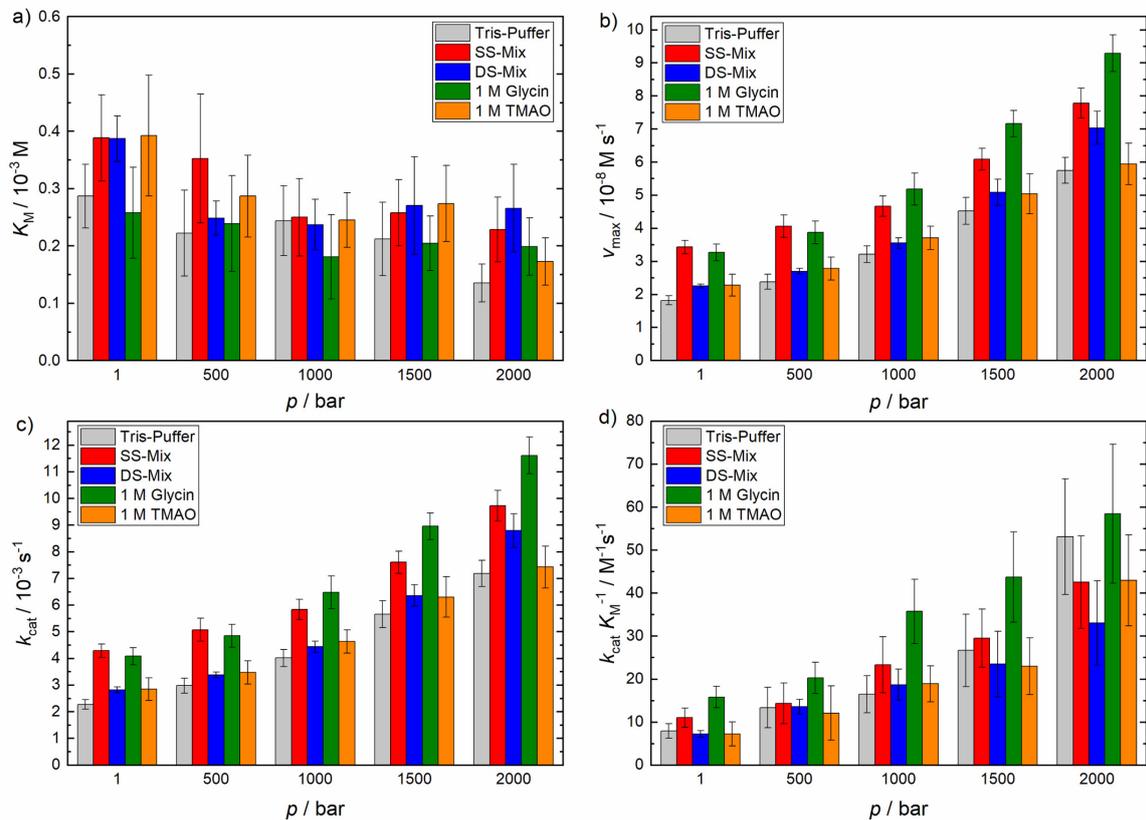


Abbildung 3-5: Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter der von  $\alpha$ -CT katalysierten Hydrolysereaktion von SPpNA in unterschiedlichen Puffer/Osmolyt-Lösungen. a) MICHAELIS-Konstante,  $K_M$ , b) maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $v_{\max}$ , c) Wechselzahl,  $k_{\text{cat}}$ , und d) katalytische Effizienz,  $k_{\text{cat}}/K_M = k_{\text{eff}}$ .

Abbildung 3-5 veranschaulicht die kinetischen Parameter der  $\alpha$ -CT-Reaktion, die für die verschiedenen Lösungsbedingungen für verschiedene Drücke bei 20 °C erhalten wurde: Die MICHAELIS-Konstante, die maximale Geschwindigkeit, die Wechselzahl und die katalytische Effizienz.  $K_M$  nimmt mit steigendem Druck geringfügig ab ( $dK_M/dp \approx -8 \cdot 10^{-5} \text{ M kbar}^{-1}$ ), d. h. die Affinität des Substrats steigt mit zunehmendem Druck im Tris-Puffer, *shrimp shallow*-Gemisch sowie im Tris-Puffer + 1 M TMAO. Hingegen nehmen  $v_{\max}$ ,  $k_{\text{cat}}$  und die katalytische Effizienz in allen Osmolytgemischen bei Kompression deutlich zu. Die  $k_{\text{cat}}$ -Werte steigen etwa um das zwei- bis dreifache und  $k_{\text{eff}}$  um den Faktor drei bis fünf bei einem Druckanstieg von 1 bis 2000 bar, wobei die größten Werte für die 1 M Glycin-Lösung beobachtet werden konnten. Die

Werte der kinetischen Parameter liegen in der gleichen Größenordnung wie diejenigen, die von SPRETI *et al.* bei Tensiden und Salzen als Cosolute berichtet wurden.<sup>[131]</sup>

Die Pufferlösungen, die hohe Konzentrationen an Glycin enthalten (*shrimp shallow*-Gemisch sowie Tris-Puffer + 1 M Glycin), weisen die höchsten  $k_{\text{cat}}$ - und  $k_{\text{eff}}$ -Werte auf. Das *deep sea*-Gemisch sowie der Tris-Puffer in Anwesenheit von 1 M TMAO haben keinen signifikanten Einfluss auf  $K_M$  und  $k_{\text{eff}}$  im Vergleich zur reinen Pufferlösung (Tris-Puffer). Diese Resultate stehen in Einklang mit den Erkenntnissen von LUONG *et al.* zur Hydrolyse von SAAPpNA durch  $\alpha$ -CT<sup>[130]</sup> und anderen Literaturdaten.<sup>[132]</sup>

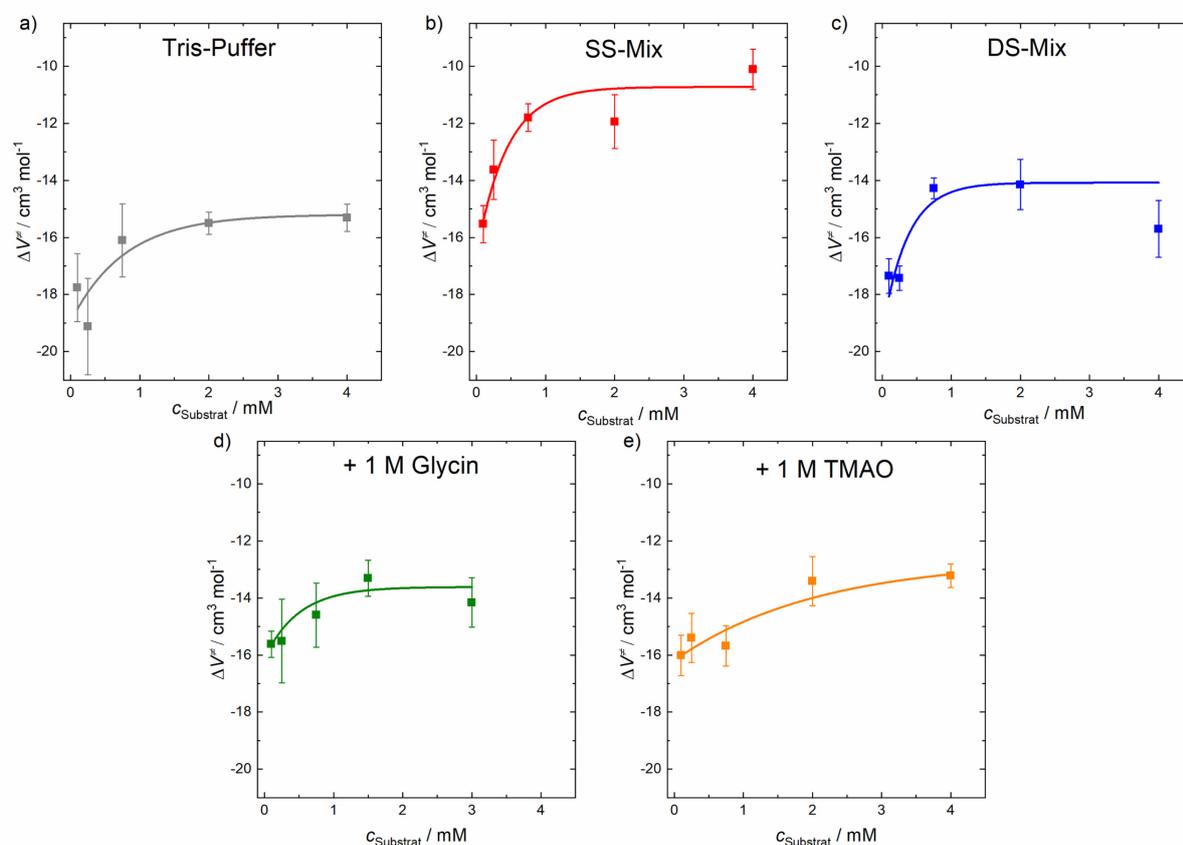


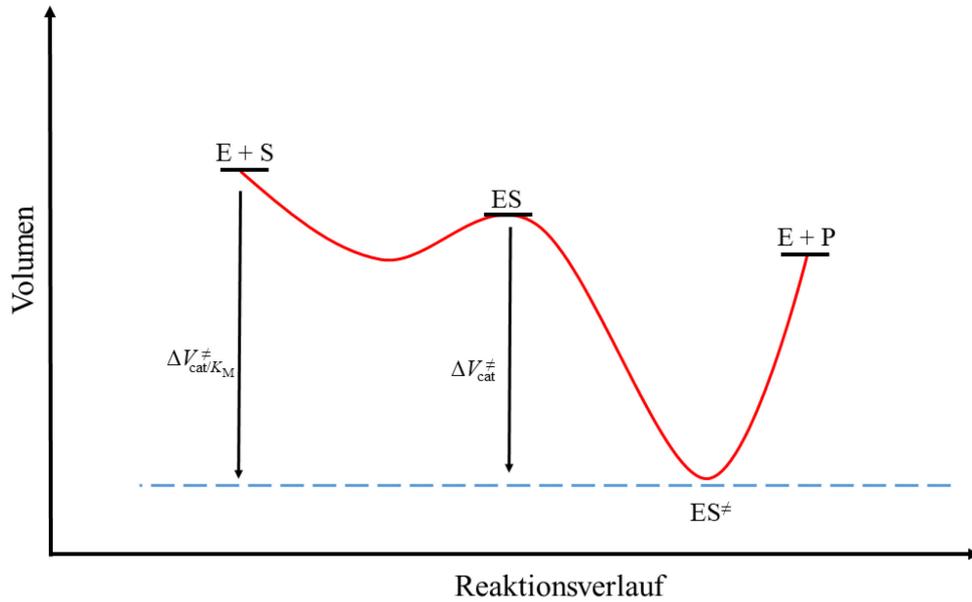
Abbildung 3-6: Auftragung des Aktivierungsvolumens,  $\Delta V^\ddagger$ , in Abhängigkeit der Substratkonzentration für die fünf gemessenen Lösungen. a) Tris-Puffer ohne Osmolyte, b) *Shrimp shallow*-Gemisch (SS-Mix), c) *Deep sea*-Gemisch (DS-Mix), d) Tris-Puffer in Anwesenheit von 1 M Glycin und e) Tris-Puffer in Anwesenheit von 1 M TMAO.

Die Steigungen der Absorptionsdaten, wie in Abbildung 3-3a gezeigt,  $s = dA_{410 \text{ nm}}/dt$ , wurden zur Bestimmung des Aktivierungsvolumens der Reaktion verwendet. Mit  $k/k_1 = s/s_1$  ( $s_1$  = Steigung bei einem bar,  $k_1$  = kinetische Konstante bei einem bar) und Gleichung 2-5 konnte das Aktivierungsvolumen  $\Delta V^\ddagger$  berechnet werden. In Abbildung 3-6 sind die ermittelten Daten des

Aktivierungsvolumens für die jeweilige Substratkonzentration dargestellt. In allen Osmolytmischungen weist  $\alpha$ -CT ein negatives Aktivierungsvolumen auf. Die Größenordnung von  $\Delta V^\ddagger = -11 \dots -18 \text{ mL mol}^{-1}$  entspricht den Werten, die in der Literatur beschrieben wurden.<sup>[79,109,133]</sup> Interessanterweise konnte hierbei festgestellt werden, dass  $\Delta V^\ddagger$  mit steigender Substratkonzentration leicht ansteigt, d. h. weniger negativ wird. Außerdem erreicht das Aktivierungsvolumen bei einer Substratkonzentration von etwa 2 mM einen Plateauwert, welcher der Konzentration entspricht, bei der das Enzym mit Substrat gesättigt ist.

Tabelle i-3 beinhaltet alle in Abbildung 3-5 grafisch aufgetragenen, kinetischen Parameter ( $K_M$ ,  $v_{\max}$ ,  $k_{\text{cat}}$ ,  $k_{\text{eff}}$ ) in Abhängigkeit des Drucks. In Tabelle i-4 sind die volumetrischen Daten in Abhängigkeit der Substratkonzentration zusammengefasst (siehe auch Abbildung 3-6). Für große Substratkonzentrationen,  $v_0 \propto k_{\text{cat}}$ , beschreibt das Aktivierungsvolumen die Differenz zwischen den Volumina des Übergangszustandes ( $\text{ES}^\ddagger$ ) und des Enzym-Substrat-Komplexes. Die Messung des Aktivierungsvolumens bei niedrigen Substratkonzentrationen, wobei  $v_0 \propto k_{\text{cat}}/K_M$  ist, beinhaltet auch die Volumenänderung bei der Substratbindung (Abbildung 3-7). Der letztgenannte Beitrag scheint nur geringfügig von den jeweiligen Lösungsbedingungen abzuhängen und beträgt etwa -2 bis -5  $\text{mL mol}^{-1}$ . Dies impliziert, dass der Enzym-Substrat-Komplex etwas kompakter als die Teilvolumina von Enzym und Substrat ist, was wahrscheinlich auf eine partielle Desolvatisierung bei der Substratbindung zurückgeführt werden kann (zum Vergleich: das Volumen eines Wassermoleküls beträgt 18  $\text{mL mol}^{-1}$ ). Das Aktivierungsvolumen des katalytischen Schritts ( $k_{\text{cat}}$ ) kann in fast allen Fällen mit -15  $\text{mL mol}^{-1}$  beziffert werden. Einzig für das *shrimp shallow*-Gemisch konnte für hohe Substratkonzentrationen ein etwas positiverer Wert von -11  $\text{mL mol}^{-1}$  ermittelt werden, was auf einen etwas weniger kompakten Übergangszustand im Vergleich zu dem Szenario in dem *deep sea*-Gemisch oder der reinen Pufferlösung hinweist. Insgesamt ist der Übergangszustand kompakter als der ES-Komplex, was auf eine Verringerung des Hohlraumvolumens und/oder durch Hydratation von Ladungen (Elektrostriktionseffekt) im Übergangszustand zurückgeführt werden könnte.

a)



b)

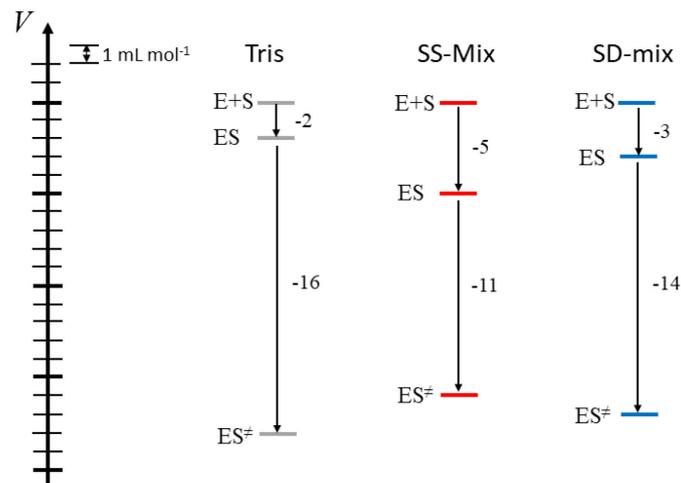


Abbildung 3-7: a) Schematische Darstellung des Volumenprofils einer enzymatischen Reaktion, wobei der Druck die Bildung des Produktes aufgrund eines negativen Aktivierungsvolumens bevorzugt. b) Aktivierungsvolumen von  $\alpha$ -CT in den verschiedenen Osmolyt-Gemischen im Vergleich zum reinen Puffer. Die partiellen Molvolumina sind in  $\text{mL mol}^{-1}$  angegeben. Der ES-Komplex ist kompakter im Vergleich zu den partiellen Volumina des Enzyms (E) und des Substrats (S) und außerdem kompressibler als der Übergangszustand ( $\text{ES}^\ddagger$ ), welcher das geringste partielle Volumen besitzt.

### 3.4 Zusammenfassung

Viele Enzyme weisen bei hohem Druck eine erhöhte Aktivität auf,<sup>[19]</sup> wobei mehr als zwei Dutzend sogar maximale Aktivität besitzen.<sup>[81]</sup> Das Verständnis des zugrunde liegenden Effekts

auf molekularer Ebene fehlt jedoch weitgehend. Während einige Enzyme intrinsisch angepasst sein könnten, um unter Druck zu funktionieren z. B. durch Mutationen, benötigen andere möglicherweise eine extrinsische Anpassung, wie beispielweise durch Cosolute.<sup>[134]</sup> Die Natur solcher Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht, die den Großteil der in der Zelle vorhandenen osmotisch aktiven, gelösten Stoffe (Osmolyte) ausmachen, ist in Bezug auf die Enzymaktivität wenig erforscht und die Wirkung natürlicher Osmolytmischungen in der Industrie weitgehend ungenutzt. Hier wurde der Einfluss von zwei verschiedenen Osmolytmischungen, die in Flachwassergarnelen (*shrimp shallow*-Gemisch) und in Tiefseegarnelen (*deep sea*-Gemisch) vorkommen, auf die enzymatische Aktivität von  $\alpha$ -CT mittels der HPSF-Methodik untersucht. Der Vorteil der Verwendung der HPSF-Methode besteht darin, dass Enzym- und Substratlösungen vor dem Mischen unter Druck gesetzt werden. Daher prüft diese Technik die Auswirkung des Drucks auf die Enzymreaktion auf direktem Wege und die kinetischen und volumetrischen Daten werden nicht durch strukturelle Relaxationseffekte beeinträchtigt.

Unter Druck werden kleinvolumige gegenüber großvolumigen Zuständen bevorzugt, was auf eine Erhöhung der Packungsdichte, z. B. durch Eindringen von Lösungsmittelmolekülen in zugängliche Hohlräume sowie durch Füllung des lösungsmittel-exponierten Hohlraumvolumens, auf die Bildung stärkerer Wasserstoffbrückenbindungen oder durch Hydratation polarer und geladener Gruppen (Elektrostriktionseffekt) erklärt werden kann.<sup>[94,135]</sup>

Die Resultate zeigen, dass das chemische Gleichgewicht in Richtung der negativen Volumenänderung der Reaktion verschoben wird. Dies gilt auch für das Bindungsgleichgewicht, dem ersten Schritt des MICHAELIS-MENTEN-Mechanismus. Zudem wird der Übergangszustand unter Druck begünstigt, wenn dessen Volumen kleiner als das der Reaktanden ist. Dies wird als negatives Aktivierungsvolumen bezeichnet, wodurch bei steigendem Druck eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante  $k$  erfolgt. In der Studie konnte beobachtet werden, dass hoher Druck die Enzymaktivität von  $\alpha$ -CT deutlich erhöht, was einem negativen Wert des Aktivierungsvolumens entspricht, der etwa  $15 \text{ mL mol}^{-1}$  beträgt. Der Übergangszustand ist in allen Osmolytlösungen kompakter als der ES-Komplex, was auf eine Abnahme des Hohlraumvolumens und/oder der Hydratation von polaren und geladenen Resten (Elektrostriktionseffekt) im Übergangszustand zurückgeführt werden kann. Aus den Messungen von  $\Delta V^\ddagger$  als Funktion der Substratkonzentration konnte zusätzlich abgeleitet werden, dass die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes mit einer geringen Volumenabnahme verbunden ist. Die Cosolvens-Studien zeigen entweder keinerlei Effekt für 1 M TMAO und den DS-Mix oder einen positiven Effekt auf die

katalytische Wechselzahl und katalytische Effizienz, welcher für die Osmolytlösungen mit der freien Aminosäure Glycin am stärksten ausgeprägt ist.

Sowohl TMAO als auch Glycin sind bekannte Stabilisatoren von Proteinen und werden als Hilfsstoffe in biopharmazeutischen Arzneiformulierungen zur Stabilisierung von therapeutischen Proteinen verwendet.<sup>[136]</sup> Im Allgemeinen können sie die thermische Stabilität eines Proteins durch direkte Wechselwirkung mit entweder den geladenen Seitenketten und/oder dem Peptidrückgrat des Proteins beeinflussen. Des Weiteren kann durch Konkurrenz von Protein und Cosolut um Wassermoleküle eine Änderung der thermischen Stabilität bewirkt werden, zum Beispiel durch bevorzugten Ausschluss von der Proteingrenzfläche und entsprechender Verstärkung des wasserstoffgebundenen Wassernetzwerks an der Proteingrenzfläche. Der letztgenannte Beitrag dominiert bei den in dieser Studie verwendeten hohen Osmolytkonzentrationen.<sup>[94,114,122,136]</sup> Trotz ihres ähnlichen proteinstabilisierenden Potenzials sind Unterschiede in der enzymatischen Aktivität der hier untersuchten enzymatischen Reaktion unter verschiedenen Bedingungen zu beobachten. Die Osmolytmischung der Flachwassergarnelen und die reine Glycinpufferlösung weisen die höchsten  $k_{cat}$ -Werte bzw. katalytischen Effizienzen auf. Einen ausgeprägten Effekt von Glycin auf die enzymatische Aktivität konnte auch im Fall der Xylanase-Reaktion beobachtet werden, was auf eine Beteiligung des Carboxylat-Ions des Glycins an der Verstärkung der katalytischen Aktivität der Xylanase schließen lässt.<sup>[137]</sup> Tatsächlich hat Glycin als Zwitterion ( $pI = 5.97$ ) die Fähigkeit, mit dem Protein sowohl über seine negativ als auch positiv geladenen Gruppen zu interagieren und aufgrund seiner relativ geringen Größe ist es sterisch nicht an einer schwachen Bindung an mehreren Stellen des Proteins gehindert.

Die verschiedenen kinetischen Größen der Reaktion in Anwesenheit von Glycin können jedoch unterschiedlichen Ursprungs sein. Änderungen in der Thermodynamik der Substratbindung, z. B. Enthalpie und Entropie, können durch kleinräumige Konformationsübergänge der Bindungstasche beeinflusst werden, die durch die jeweilige Lösungsumgebung induziert werden, was auch die Flexibilität der Bindungstasche verändern kann.<sup>[138,139]</sup> Aufgrund unterschiedlicher Kompressibilitäten im Bereich des aktiven Zentrums könnte eine Druckerhöhung zu geringeren Konformationsänderungen führen.<sup>[139,140]</sup> Die Bestimmung der thermodynamischen Aktivität kann erforderlich sein, um die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Szenarien zu erleichtern, indem das reale Mischungsverhalten der hier verwendeten Mehrkomponentenlösungen berücksichtigt wird. Um ein zutreffendes aktivitätsbasiertes Reaktionsgleichgewicht und kinetische Parameter bei enzymatischen Reaktionen zu erhalten, müssen

Aktivitätskoeffizienten eingeführt werden.<sup>[94]</sup> Solche Daten können aus Experimenten und theoriebasierten Berechnungen, z. B. durch *perturbed-chain statistical associating fluid theory* (PC-SAFT<sup>[94]</sup>), bei zukünftigen Untersuchungen von Enzymreaktionen in solch komplexen Lösungsmittelgemischen erhalten werden und können helfen, die verschiedenen Beiträge zur Aktivität von Enzymen in komplexen Lösungsumgebungen herauszuarbeiten, um die Enzymreaktionen in technologischen Anwendungen zu optimieren. Die Aufklärung des Mechanismus der Substratbindung und der Reaktion auf atomarer Ebene in solch komplexen Osmolytmischungen bei atmosphärischem und hohem Druck bleibt jedoch nach wie vor eine gewaltige Herausforderung. Bisher wurden hierzu nur wenige Fortschritte für kleine Enzymmodellen erzielt, bei denen Molekulardynamik (MD)-Simulationen und Quanten-/Molekularmechanik (QM/MM)-Simulationen der freien Energie eingesetzt wurden.<sup>[140]</sup>

## 4. Druck- und Cosolvens-Modulation der katalytischen Aktivität von Amyloidfibrillen

### 4.1 Einleitung

Eine große Anzahl neurodegenerativer, menschlicher Erkrankungen ist mit der Bildung extrazellulärer Amyloidablagerungen oder intrazellulärer, amyloidähnlicher Krankheiten verbunden.<sup>[54,141,142]</sup> Diese Amyloidstrukturen werden durch lösliche Proteine oder Peptide gebildet, die sich zu unlöslichen Fibrillen zusammenlagern.<sup>[54,141–146]</sup> Bekannte Beispiele für Amyloiderkrankungen sind Alzheimer, Parkinson und Typ-II-Diabetes. Daher wird derzeit intensiv daran geforscht, die Struktur der Amyloidfibrillen und deren Entstehungsmechanismus aufzuklären. Ein gemeinsames Merkmal vieler Fibrillen unterschiedlichen Ursprungs ist ihre strukturelle Ähnlichkeit. Es handelt sich um stark strukturierte, molekulare Anordnungen, die von einer hochperiodischen  $\beta$ -Faltblattstruktur dominiert werden, eine hohe Stabilität aufweisen, widerstandsfähig gegen Abbau sind und sich auch unter extremen Bedingungen bilden.<sup>[54,147–150]</sup>

In den letzten Jahren wurden Amyloidfibrillen *in vivo* auch als funktionelle biologische Einheiten identifiziert, die sich für technische Anwendungszwecke als wertvoll erwiesen haben.<sup>[151,152,161,153–160]</sup> In der Bionanotechnologie stellen Amyloidfibrillen eine neuartige Klasse von Systemen dar, die attraktive Vorteile bieten, wie zum Beispiel effiziente Selbstorganisation sowie mechanische Festigkeit.<sup>[153]</sup> Elektrisch leitfähige Nanodrähte können unter Verwendung von Amyloidfibrillen als Templat für selektive Metallabscheidungen hergestellt werden.<sup>[155]</sup> Fibrilläre Strukturen können auch makroskopische Hydrogele bilden, die für die Herstellung künstlicher biologischer Gewebe,<sup>[159]</sup> die Immobilisierung von Proteinen<sup>[160]</sup> oder für die Freisetzung von Medikamenten geeignet sind.<sup>[152,161]</sup>

Aufgrund ihrer kleinen molekularen Bausteine, ihrer Fähigkeit sich leicht selbst zusammenzulagern, robust und katalytisch aktiv zu sein, könnten Amyloidfibrillen auch als Vorläufer der heutigen Enzyme gedient haben.<sup>[47,51,53,58]</sup> Kürzlich berichteten RUFO *et al.* von *de novo* entworfenen Amyloid-bildenden Peptiden, die eine bemerkenswerte enzymatische Aktivität aufweisen. Es handelt sich hierbei um Heptapeptide, die die Aktivität und die Struktur des aktiven Zentrums der  $\gamma$ -Carboanhydrase in Gegenwart von Zink nachahmen.<sup>[57]</sup> Andere Studien verwendeten kurze, selbstassemblierende Peptide, welche die katalytische Triade (Asp-His-Ser) enthalten, um die katalytische Aktivität von Serinproteasen zu imitieren.<sup>[162,163]</sup> MONASTERIO *et al.* stellten ein neues katalytisches aspartathaltiges Amyloid vor, das in metallabhängig-

ger Weise eine ATPase-ähnliche Aktivität aufweist.<sup>[164]</sup> In einer weiteren Studie wird die bedeutsame Rolle von Metallionen im Zusammenhang mit *de novo* entworfenen Peptiden untersucht, bei der in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einerseits supramolekulare Strukturen gebildet wurden und andererseits im Gegensatz zu anderen Metallionen die Oxidation von Dimethoxyphenol bevorzugt abläuft.<sup>[165]</sup> Die Simplizität des Aufbaus solcher katalytischen Amyloidfibrillen kann bei der Entwicklung neuer Katalysator-Nanomaterialien genutzt werden. Aus dem gleichen Grund ist es vorstellbar, dass Amyloidfibrillen im Laufe der Evolution des Lebens als katalytisches Material gedient haben könnten.<sup>[47,51,53,165–167]</sup>

Aufgrund der Tatsache, dass sich das Leben auf der Erde unter harschen Umweltbedingungen in der Tiefsee entwickelt haben kann, sind Untersuchungen von biomolekularen Systemen unter solchen Bedingungen und der entsprechenden Anpassungsmechanismen Gegenstand zahlreicher aktueller Studien.<sup>[16,45,93,94,98,103,168]</sup> In Tiefseeorganismen wurde eine relativ hohe Konzentration an Osmolyten gefunden, wie beispielsweise Trimethylamin-*N*-oxid oder Harnstoff.<sup>[23,95]</sup> TMAO ist ein stabilisierendes Cosolvent, das durch den *excluded volume* Effekt die kompakte native Faltung von Proteinen begünstigt,<sup>[169]</sup> während Harnstoff durch direkte Wechselwirkung mit dem Proteinrückgrat eine destabilisierende Wirkung auf Proteine hat.<sup>[22,170]</sup> Außerdem wird angenommen, dass TMAO den nachteiligen Druckeffekten auf biomolekulare Systeme entgegenwirkt.<sup>[23]</sup>

Neben Osmolyten zeichnen sich biologische Zellen durch große Mengen an Makromolekülen aus, die etwa 30 % ihres Gesamtvolumens ausmachen. Daher sollte ein solcher Effekt bei jeder Diskussion über die Stabilität und Funktionalität von Enzymen berücksichtigt werden.<sup>[28,171,172]</sup> Weitgehend inerte, makromolekulare *Crowder*-Substanzen, wie die Polysaccharide Ficoll oder Dextran, können verwendet werden, um die hohe intrazelluläre Konzentration von Makromolekülen zu simulieren.

Ziel dieser Studie war es, die Stabilität und Funktionalität der *de novo* entwickelten, katalytischen Amyloidfibrille (AF) Ac-IHIHIQI-CONH<sub>2</sub> in Abhängigkeit der Temperatur und des Drucks sowie in Abwesenheit und Gegenwart von Cosolventien und makromolekularen *Crowdern* zu untersuchen. Die Kenntnis der Auswirkungen extremer Umweltbedingungen auf die katalytische Aktivität fibrillärer Systeme ist auch für den Einsatz in biotechnologischen Prozessen, die oft unter harschen Bedingungen ablaufen, diskussionswürdig.

## 4.2 Probenpräparation, Peptidsynthese und Fibrillenbildung

Die verwendeten Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Tris-HCl-Puffer (pH = 8), welcher 25 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) und 1 mM ZnCl<sub>2</sub> enthielt, wurde zur Herstellung der Peptid- und Substratlösung verwendet. Für die Cosolvens- und *Crowder*-Untersuchungen wurde die Pufferlösung mit 0.5 M TMAO, 1 M Harnstoff oder 25 gew.-% Ficoll® PM70 hergestellt. Das Peptid Ac-IHIHIQI-CONH<sub>2</sub> (AF2) wurde von dem interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF in Leipzig, Core Unit Peptid-Technologien) mit einer Reinheit von mindestens 98 % (w/w) synthetisiert. Die Amyloidfibrillenbildung wurde, wie bei RUFO *et al.*<sup>[57]</sup> ausführlich beschrieben, folgendermaßen ausgeführt: Zunächst wurde das Peptid in 10 mM Salzsäure gelöst, um Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> herzustellen. 180 µL der Stammlösung wurden anschließend mit 20 µL Isopropanol gemischt, gefolgt von der Zugabe von 1.8 mL Tris-HCl-Puffer (pH = 8, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>). Um die Fibrillenbildung zu induzieren, wurde die Lösung bei Raumtemperatur 3 Tage lang inkubiert. Die Fibrillen wurden lyophilisiert und unmittelbar vor der Messung erneut in Wasser gelöst, um eine 0.1 mM Stammlösung zu erhalten. Das Substrat *p*-Nitrophenylacetat (*p*-NPA) wurde in Acetonitril gelöst, um eine 0.1 M Stammlösung herzustellen. Die Peptid- und Substratlösungen wurden durch Verdünnen der Stammlösungen mit den jeweiligen Pufferlösungen erhalten, um die Zielkonzentration unmittelbar vor den Experimenten zu erreichen. Für alle Messungen wurde die endgültige Konzentration der Amyloidfibrillen auf 15 µg mL<sup>-1</sup> (~16 µM) festgelegt, während die Substratkonzentration von 100 bis 800 µM variiert wurde. Die Endkonzentration von Acetonitril betrug in allen Reaktionsgemischen 2 % (v/v). Die enzymatische Reaktion von *p*-NPA unter Bildung des Produktes *p*-Nitrophenol (Abbildung 4-1), wurde mithilfe der Hochdruck-Stopped-Flow-Apparatur (HPSF-56) verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient von *p*-NP bei 405 nm wurde experimentell mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie bestimmt (22 °C,  $\epsilon = 13930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Der Druck wurde mithilfe einer Hochdrucksteuereinheit geregelt und schrittweise in 500 bar-Schritten von 1 bar auf 2000 bar erhöht. Die Temperatur wurde mithilfe eines externen Umlaufwasserthermostat kontrolliert und konstant auf  $22 \pm 0.1 \text{ °C}$  gehalten. Die druckabhängigen FTIR-Daten wurden mit einem Nicolet Magna 550-Spektrometer aufgezeichnet, das mit einem MCT-Detektor ausgestattet ist. Für ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis in der DAC-Zelle wurde in reinem D<sub>2</sub>O eine Probenkonzentration von 60 mg mL<sup>-1</sup> gewählt. Ein externer Umlaufwasserthermostat diente als Temperaturkontrolle, um die Temperatur von 25 °C aufrechtzuerhalten. Nach jeder Druckän-

derung wurde die Probe vor der Aufnahme eines IR-Spektrums 5 Minuten lang äquilibriert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Thermo GRAMS-Software (siehe Kapitel 2.2.2 Experimentelles). Für die Analyse der IR-Schwingungen wurden zwei Spektralbereiche untersucht, die Amid-I'-Bande ( $1580\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) und die Alkan-Spektralregion ( $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ). Der erste Bereich ist mit C=O-Streckschwingung der Aminosäuren verknüpft, die zweite Region bezieht sich auf die symmetrischen und asymmetrischen Schwingungen der in den Aminosäureseitenketten vorhandenen Alkane (siehe Tabelle 2-1).<sup>[84,173]</sup>

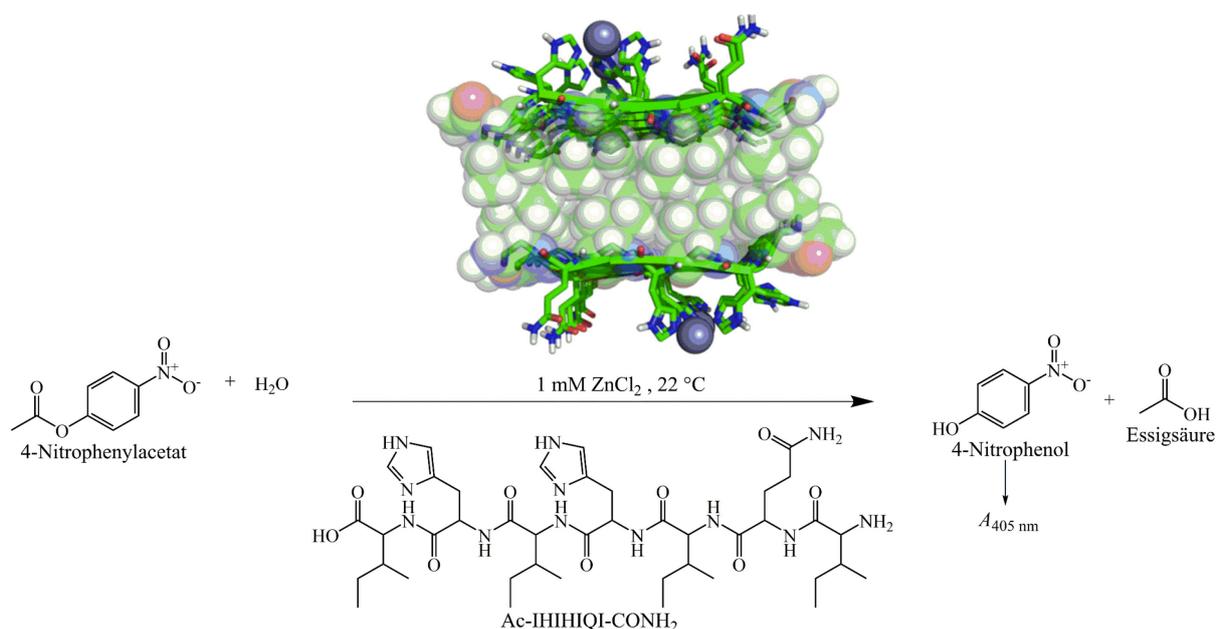


Abbildung 4-1: Reaktionsgleichung der Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol und Essigsäure durch Ac-IHIHIQI-CONH<sub>2</sub>. Bei der Ac-IHIHIQI-CONH<sub>2</sub>-katalysierten Reaktion von 4-Nitrophenylacetat werden die beiden Produkte Essigsäure und 4-Nitrophenol. Die Schemata der Amyloidfibrillen sind aus der Quelle<sup>[57]</sup>, mit Genehmigung von Springer Nature © 2014, modifiziert worden.

### 4.3 Ergebnisse und Diskussion

Um die Druckstabilität der AF zu analysieren, wurden Hochdruck-FTIR-Experimente durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Amid-I'-Bande (bei  $1580\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) empfindlich auf Veränderungen in der Sekundärstruktur von Proteinen reagiert.<sup>[79,84,173]</sup> Das FTIR-Spektrum der AF (Abbildung 4-2) zeigt keine signifikanten Veränderungen der Amid-I'-Bande bei einem Druckanstieg bis zu 10 kbar, was auf eine hohe Persistenz der fibrillären Struktur, selbst bei extremen Drücken, hinweist. Die Hauptbande bei  $1625\text{ cm}^{-1}$  ist charakteristisch für das Vorhandensein von intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern. Das Fehlen einer Bande im *random coil*-Bereich

( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) deutet darauf hin, dass die Amyloidfibrillen im gesamten untersuchten Druckbereich stabil bleiben. Die geringfügigen, druckinduzierten Verschiebungen sind nur auf eine elastische Verschiebung der Schwingungsmodi zurückzuführen. Dies gilt auch für die symmetrischen und asymmetrischen Schwingungsbanden der  $\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen der Seitenkettschwingungen der Aminosäuren (H, I, Q), die im Spektralbereich von  $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten sind. Die hohe Druckstabilität ist wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Packung der Aminosäuren in den AF weitgehend frei von Hohlräumvolumen ist, was als ein Hauptgrund für die druckinduzierte Entfaltung von Proteinen angesehen wird.<sup>[100,174]</sup>

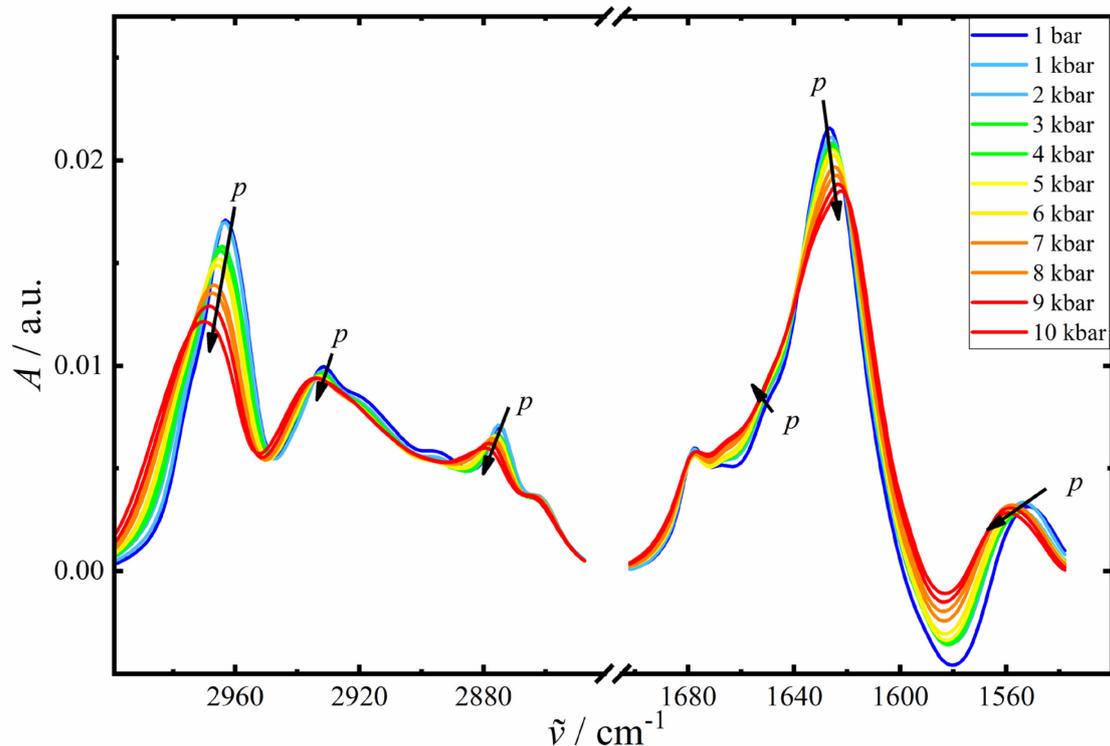


Abbildung 4-2: Druckabhängige FTIR-Spektren der Amyloidfibrillen in der Amid-I'-( $1520\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) und Alkan-( $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ) Spektralregion (6 gew.-% AF,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , bis 10 kbar).

Bei allen Pufferzusammensetzungen kann der Verlauf der  $A_{405\text{nm}}(t)$  durch MICHAELIS-MENTEN-Diagramme beschrieben werden. Dabei ist bei den verwendeten hohen Substratkonzentrationen die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion,  $v_0 [\text{E}]^{-1}$ , annähernd proportional zur Wechselzahl,  $k_{\text{cat}}$ . Wie in Abbildung 4-3 deutlich gezeigt ist, steigt  $v_0 [\text{E}]^{-1}$  mit zunehmendem, hydrostatischem Druck an, was auf eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch ein negatives Aktivierungsvolumen (Gleichung 2-6) hinweist. Durch den Vergleich der MICHAELIS-MENTEN-Kurven in reiner Pufferlösung mit denen in Gegenwart von 0.5 M TMAO oder 25 gew.-%

Ficoll PM70, welches die zellulären *Crowding*-Bedingungen nachahmen soll, wird eine zusätzliche signifikante Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigt 1 M Harnstoff im Vergleich zum reinen Puffer keine deutlichen Veränderungen in der Reaktionsgeschwindigkeit.

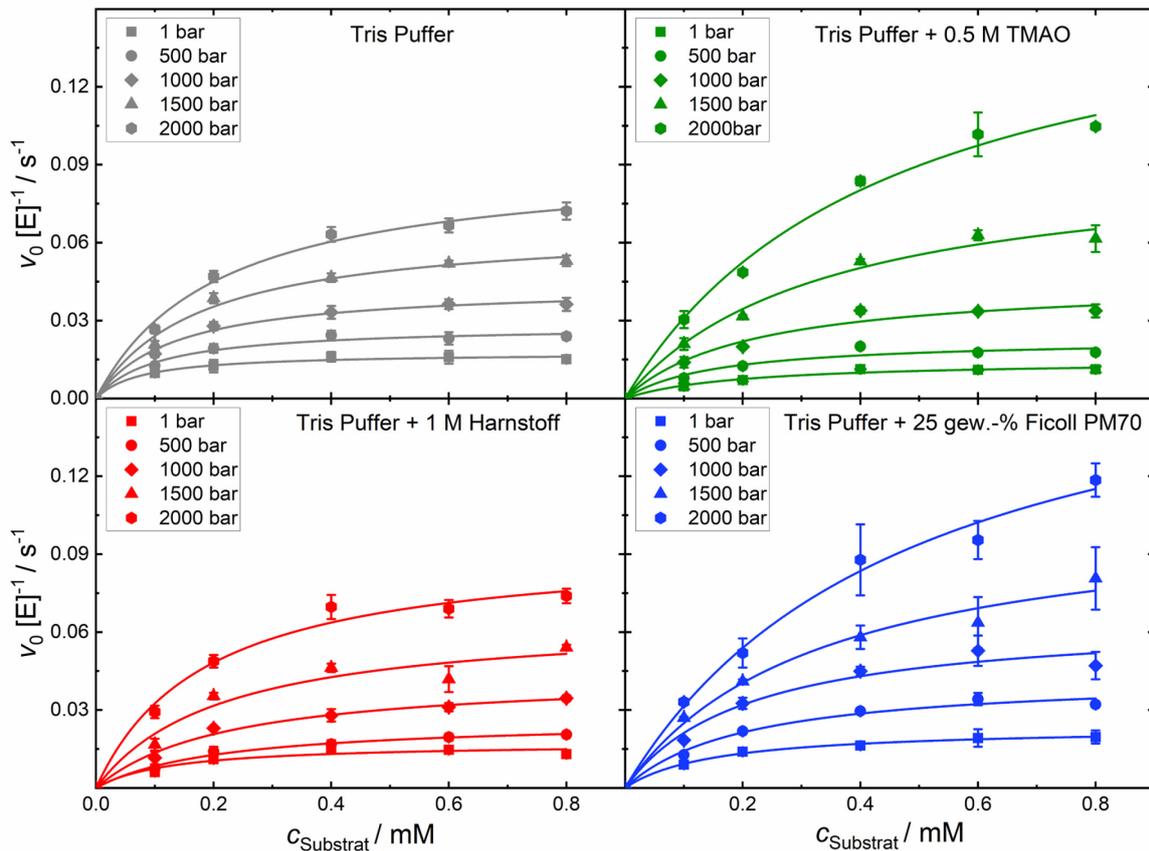


Abbildung 4-3: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme der enzymatischen Aktivität der Amyloidfibrillen bei verschiedenen Substratkonzentrationen,  $c_{\text{Substrat}}$ , und Drücken bei 22 °C. Reiner Puffer (Tris) ohne Osmolyt oder *Crowder* (grau), Puffer + 0.5 M TMAO (grün), Puffer + 1 M Harnstoff (rot) und Puffer + 25 gew.-% Ficoll PM70 (blau).

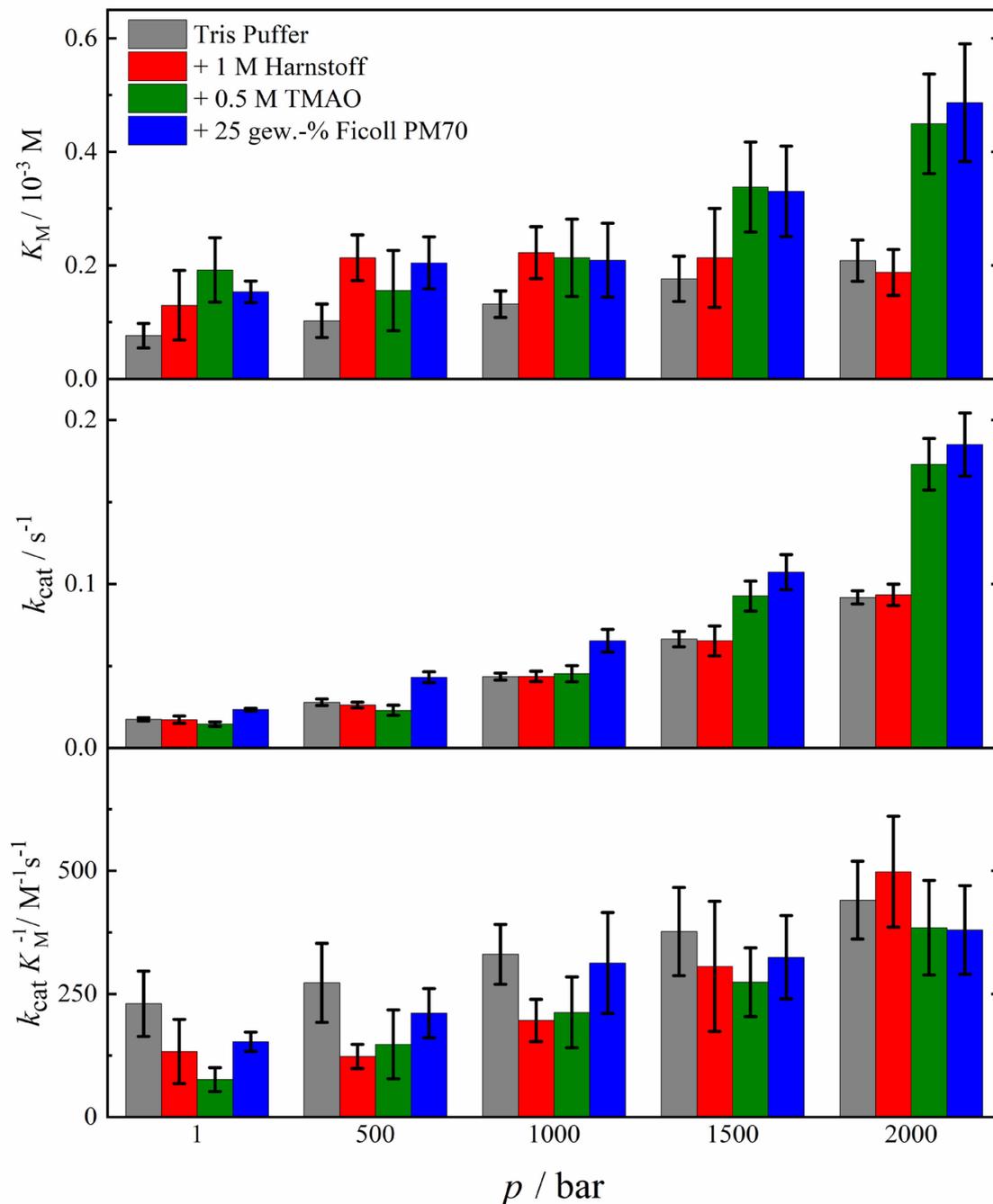


Abbildung 4-4: Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter MICHAELIS-Konstante,  $K_M$ , katalytische Wechselzahl,  $k_{cat}$ , und katalytische Effizienz,  $k_{cat}/K_M$ , der AF-katalysierten Hydrolysereaktion von pNPA in verschiedenen Puffer-/Osmolytlösungen bei  $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Abbildung 4-4 veranschaulicht die entsprechenden, kinetischen Parameter: Die MICHAELIS-Konstante  $K_M$ , die Wechselzahl  $k_{cat}$ , und die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_M$  der Reaktion für alle aufgeführten Bedingungen bei  $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $K_M$  nimmt mit steigendem Druck im Tris-Puffer leicht zu, d. h. die Affinität des Substrats verringert sich mit zunehmendem Druck geringfügig. Nach Zugabe von 0.5 M TMAO und 25 gew.-% Ficoll PM70 steigt der  $K_M$ -Wert um den Faktor zwei

bis drei bei einer Druckerhöhung von einem bis 2000 bar, wohingegen 1 M Harnstoff keinerlei oder nur einen geringen Einfluss auf  $K_M$  hat. Bemerkenswert ist, dass  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/K_M$  für alle Lösungsbedingungen bei Kompression des Systems signifikant ansteigen. Insbesondere nimmt die Wechselzahl um das fünf- bis zwölfwache zu, wobei die größten Werte für 0.5 M TMAO und 25 gew.-% Ficoll PM70 ermittelt werden konnten. Die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_M$  steigt in dem gemessenen Druckbereich bis 2000 bar um den Faktor zwei bis fünf an, wobei die größten Änderungen für 0.5 M TMAO und 1 M Harnstoff beobachtet werden konnten.

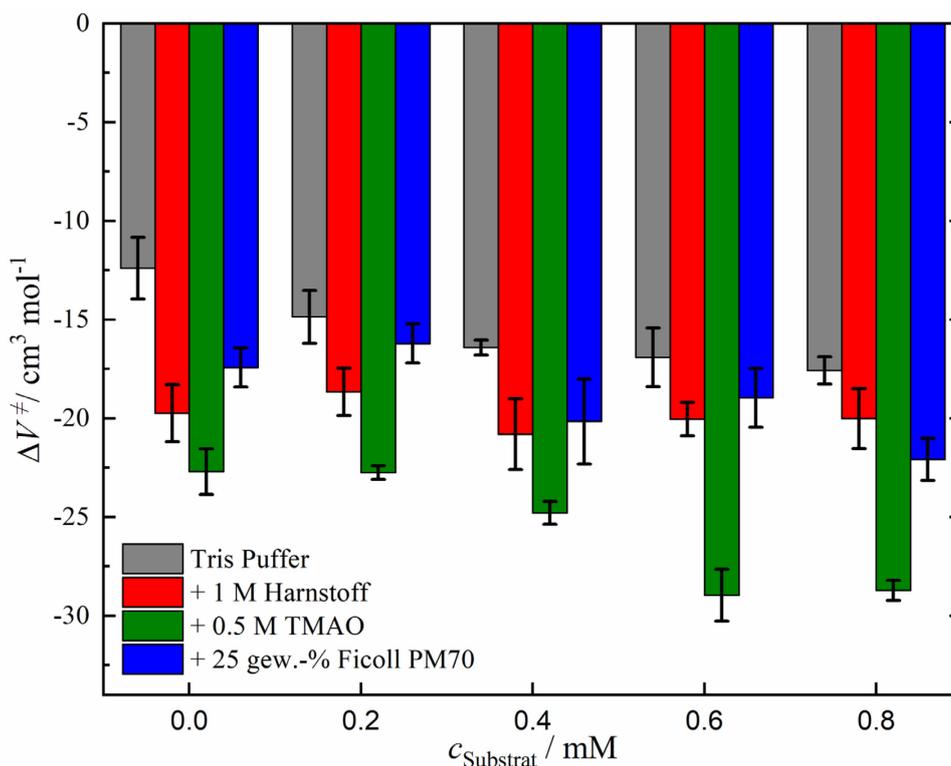


Abbildung 4-5: Aktivierungsvolumen in Abhängigkeit der Substratkonzentration (*p*NPA) für alle Puffer-/Osmolytlösungen: Tris-Puffer ohne Osmolyt oder *Crowder* (grau), Puffer + 0.5 M TMAO (grün), Puffer + 1 M Harnstoff (rot) oder Puffer + 25 gew.-% Ficoll PM70 (blau).

In Abbildung 4-5 ist das Aktivierungsvolumen der AF-Reaktion in Abhängigkeit der Substratkonzentration für die verschiedenen Pufferlösungen dargestellt.  $\Delta V^\ddagger$  liegt in der Größenordnung von -12 bis -29 mL mol<sup>-1</sup>. Die negativen Werte weisen auf eine geringere Kompression des Peptid-Substrat-Komplexes (ES) im Vergleich zum Übergangszustand (ES<sup>‡</sup>) hin. Im Gegensatz zu hohen Substratkonzentrationen, bei denen  $v_0 \propto k_{cat}$  gilt und das Enzym durch das Substrat gesättigt ist, hängt das Aktivierungsvolumen bei niedrigen Substratkonzentrationen auch vom  $K_M$ -Wert ab, wobei  $\Delta V^\ddagger$  die Volumenänderung der Substratbindung miteinbezieht (siehe Abbildung 4-6).<sup>[79]</sup> Die Aktivierungsvolumina der Reinpuffer-, 0.5 M TMAO- und 25 gew.-%

Ficoll-PM70-Lösungen nehmen mit zunehmender Substratkonzentration ( $5-7 \text{ mL mol}^{-1}$ ) geringfügig ab, was darauf hindeutet, dass die Bildung des ES-Komplexes mit einer Volumenzunahme verbunden ist. Außerdem konnte in einer vorherigen Studie von LUONG<sup>[175]</sup> gezeigt werden, dass auch mit zunehmender Temperatur die AF-katalysierte Hydrolyse-Reaktion beschleunigt wird. Eine Erhöhung der Temperatur von  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit um mehr als das Zweifache, wobei die ARRHENIUS-Aktivierungsenergie in der Größenordnung von  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$  liegt.<sup>[175]</sup>

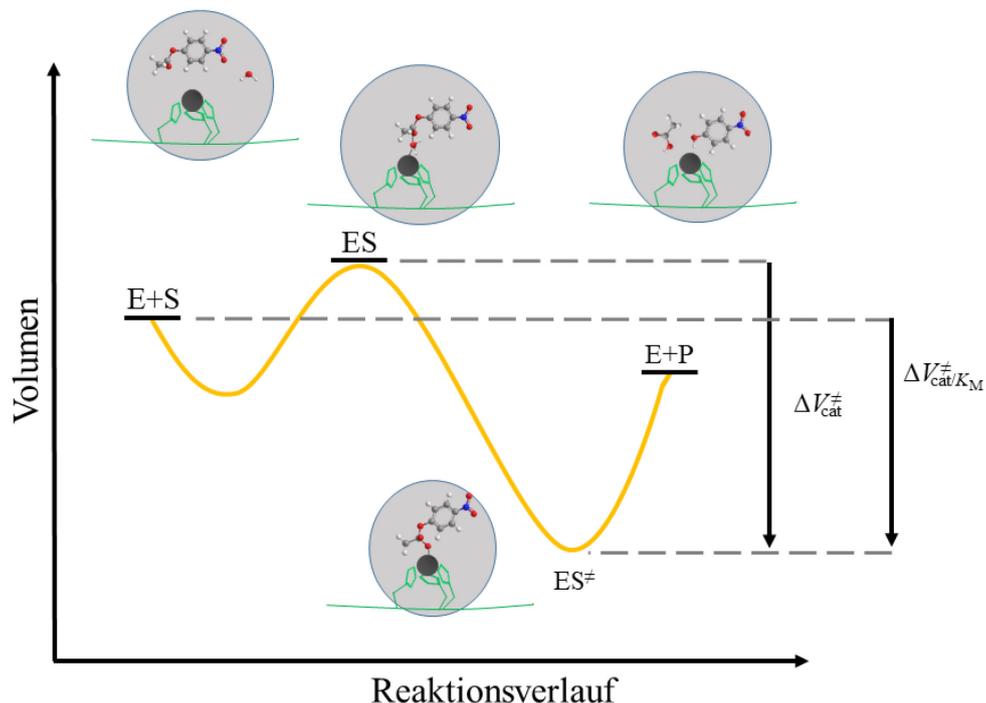


Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des Volumenprofils der enzymatischen Reaktion (E = Enzym, S = Substrat, ES = Enzym-Substrat-Komplex,  $\text{ES}^{\ddagger}$  = Übergangszustand, P = Produkt), wobei der steigende Druck die Produktbildung begünstigt.

#### 4.4 Zusammenfassung

Die Studie hat gezeigt, dass hoher hydrostatischer Druck die Produktumwandlung durch eine stärkere Kompression des Übergangszustands ( $\text{ES}^{\ddagger}$ ) gegenüber dem Enzym-Substrat-Komplex (ES) begünstigen kann. Im Allgemeinen führt eine Druckperturbation zu Zuständen, die ein geringeres molares Teilvolumen aufweisen. Der Übergangszustand ist für alle Lösungsbedingungen kompakter als der ES-Komplex, was auf eine Abnahme des Hohlraumvolumens und/oder der Hydratation polarer und geladener Reste (Elektrostriktionseffekt) im Übergangszustand zurückgeführt werden kann.

Bemerkenswerterweise brachten die Cosolvens-Studien einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Wechselzahl und die katalytische Effizienz für TMAO und dem *Crowder* Ficoll zum Vorschein. Neben den katalytisch aktiven Amyloidfibrillen wurde gezeigt, dass Cosolventien und Druck die Fähigkeit besitzen, die enzymatische Aktivität auch von größeren nativen Enzymen, wie zum Beispiel  $\alpha$ -Chymotrypsin, zu verbessern.<sup>[98,168,175,176]</sup> TMAO ist ein bekannter Stabilisator von Proteinen und wirkt durch bevorzugten Ausschluss von der Proteingrenzfläche und entsprechender Verstärkung des Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen an der Proteingrenzfläche. Ein solcher Effekt kann zu einem noch geringeren  $ES^\ddagger$ -Volumen und somit zu einem negativeren  $\Delta V^\ddagger$ -Wert führen. Die *Crowder*-Substanz Ficoll PM70 kann in ähnlicher Weise wirken. Sowohl Cosolute als auch Druck führen zu einer Erhöhung von  $K_M$ , was auf eine Abnahme der Bindungsaffinität hindeutet. Ein solcher Effekt kann auf geringfügige Änderungen der Enzym-/Substrat-Hydratation und kleinräumigen Veränderungen der Bindungstasche des Enzyms und seiner Flexibilität zurückgeführt werden. Harnstoff, von dem bekannt ist, dass dieser schwach an der Proteingrenzfläche bindet, hat bei solch niedrigen Konzentrationen (0.5 M) keinen signifikanten Einfluss auf die enzymatischen Parameter. Aufgrund der hohen Komplexität des Systems untersuchten nur sehr wenige Studien den Einfluss des makromolekularen *Crowdings* auf die Reaktionskinetiken *in silico*. Im Falle einer diffusionskontrollierten Reaktion führt die Verringerung der Diffusion zu einer reduzierten Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund von Kollisionen mit den *Crowder*-Molekülen sowie gegenseitigen Wechselwirkungen ab.<sup>[37]</sup> Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit einer reaktiven Begegnung relativ gering, diese auch als anisotrope Reaktivität bezeichnet wird. Käfigeffekte von *Crowdern*, die die Reaktanden in der Nähe halten, wirken diesem Effekt entgegen.<sup>[177]</sup> Daher kann sich die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine höhere Wahrscheinlichkeit der Neuausrichtung und der Rekollision erhöhen.<sup>[177,178]</sup>

Langfristig können molekulare Simulationen, möglicherweise mittels druck-/lösungsmittelanangepassten Kraftfeldern, helfen, unser Verständnis von Enzymen unter kombinierten Temperatur-Druck-Cosolvens-Bedingungen zu verbessern. Die theoretische Behandlung von AF-Enzymen ist aufgrund der beträchtlichen Systemgröße sehr schwierig. Um unser mechanistisches Verständnis der Auswirkungen des Drucks auf Zinkmetalloenzyme zu verbessern, wurde daher eine Zink-Finger-Hydrolase mit 22 Resten unter Verwendung einer Kombination aus klassischer MD-Simulation und QM/MM-Berechnungen der freien Energie untersucht.<sup>[140]</sup> Tatsächlich stimmen die experimentellen Ergebnisse mit den rechnerischen überein, die darauf

hindeuten, dass der Übergangszustand kompakter ist als der Reaktandenzustand und dieser auch mit einem Carboanhydrase-ähnlichen Mechanismus vereinbar wäre.

Wie hier gezeigt wurde, können aufgrund der hohen Druck- und Temperaturstabilität katalytisch aktiver Amyloid-Fibrill-Strukturen in Verbindung mit optimierten Cosolvens- und *Crowder*-Gemischen deutlich höhere Umsatzzahlen pro Molekulargewicht bei gleichzeitig hoher Langzeitstabilität des Enzyms erreicht werden. Schließlich können solche Studien dazu beitragen, einen Zusammenhang zwischen der Entstehung der Proteinkatalyse während der Evolution proteinartiger Enzyme herzustellen, die in der Tiefsee begonnen haben könnte, wo Drücke bis zu 1 kbar herrschen und viele Lebensformen auch heute noch existieren.

## 5. Stabilität des Chaperonin-Systems GroEL/GroES unter extremen Umgebungsbedingungen

### 5.1 Einleitung

Chaperonine stellen eine wichtige Klasse von Proteinen in biologischen Organismen, wie Archaeen, Bakterien und Eukarya, dar, die eine wesentliche Rolle bei der Unterstützung der Proteinfaltung spielen, indem sie die naszierenden Proteine in einem ATP-gesteuerten Mechanismus vorübergehend einkapseln, um eine Fehlfaltung oder Aggregation zu verhindern. Darüber hinaus kann der stressinduzierten Denaturierung von Proteinen entgegengewirkt werden, indem das Chaperonin die korrekte Rückfaltung unterstützt.<sup>[44,179–181]</sup> Hier untersuchten wir den temperatur- und druckinduzierten Einfluss auf die Konformationsstabilität des Hitzeschockprotein (Hsp)-Komplexes GroEL-GroES von *Escherichia coli* (Abbildung 5-1a), der zu den Chaperoninen der Gruppe I gehört. Chaperonine sind, wie der GroEL-GroES-Komplex, oligomere Proteine, die aus einer großen Doppelringstruktur bestehen und einen zentralen Hohlraum besitzen. Der deckelartige Cofaktor GroES besteht aus sieben identischen 10 kDa-Untereinheiten, die zu einem Heptamer-Ring zusammengesetzt sind und die Enden des GroEL-Zylinders verschließen. Zwei heptamere Ringe von GroEL (jede Untereinheit enthält ~ 57 kDa) bilden den Hohlraum und legen hydrophobe Aminosäurereste für die Bindung von Faltungszwischenprodukten frei. Jede Untereinheit kann in eine apikale, eine intermediäre und äquatoriale Domäne unterteilt werden, die unterschiedliche Funktionen während des Reaktionszyklus haben.<sup>[44,179,182]</sup> Im ersten Schritt des Reaktionszyklus (Abbildung 5-1b) bindet das nicht-native Protein an das freie Ende eines GroEL-GroES-Komplexes. Die ATP-vermittelte Konformationsänderung jeder Untereinheit von GroEL (hellgrün) und die Bindung von GroES führt zur Einkapselung des Proteins. Innerhalb des Chaperonin-Nanokäfigs erfolgt die Faltung, während für die ATP-Hydrolyse an jeder Untereinheit des heptameren Rings (purpur) etwa 2-10 Sekunden vergehen. Die ATP-Bindung an dem gegenüberliegenden Ring veranlasst die Freisetzung von GroES und des gefalteten Proteins, wodurch der Proteinfaltungszyklus des Chaperonin-Systems abgeschlossen wird. Im Falle einer unvollständigen Faltung des Proteins wird es sich nach der Freisetzung wieder neu binden.<sup>[44,179,181–184]</sup>

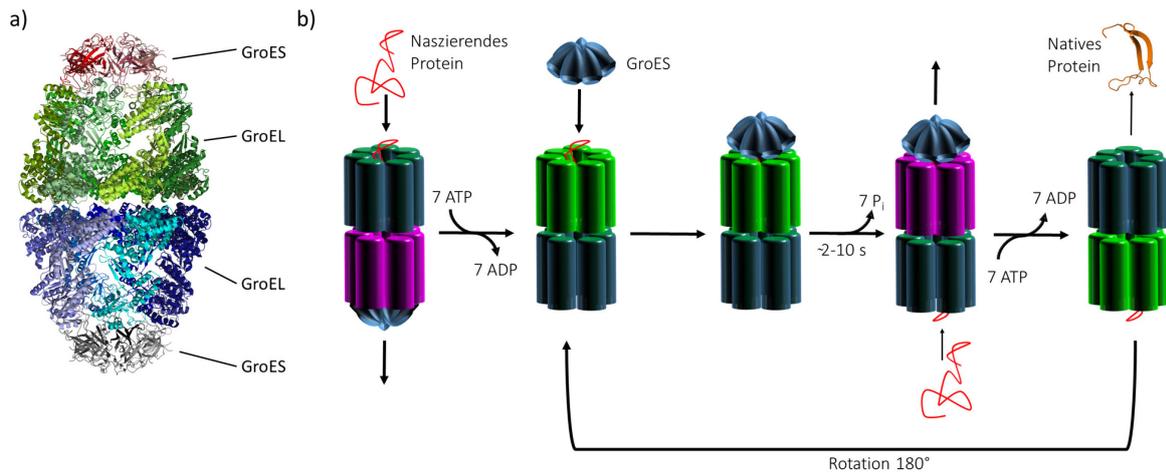


Abbildung 5-1: a) Sekundärstrukturdarstellung des GroEL-GroES-Komplexes (PDB: 3WVL), b) Schema des Reaktionszyklus des GroEL-GroES-Systems.

Während des Translationsprozesses von Proteinen helfen Chaperonine neben der Qualitätskontrolle auch bei der korrekten Rückfaltung denaturierter Proteine.

Aber wie steht es um die Stabilität des Chaperonin-Systems selbst unter extremen Umgebungsbedingungen? Bisher wurde nur eine Reihe von biochemischen und strukturellen Studien durchgeführt, in denen die Auswirkungen von Salzen, Liganden und Temperatur untersucht wurden.<sup>[184-189]</sup> Über die Auswirkung des Drucks auf die Stabilität des Chaperonin-Systems ist fast nichts bekannt. Ein großer Teil der globalen Biosphäre liegt in der Tiefsee und am Meeresgrund bei Drücken von bis zu 1 kbar.<sup>[45,97,190,191]</sup> Tatsächlich wurde kürzlich gezeigt, dass marine Sedimente einen der größten mikrobiellen Lebensräume der Erde darstellen, sogar bis zu etwa 2 km unter dem Meeresboden, wo neben hohem Druck auch steigende Temperaturen anzutreffen sind.<sup>[191]</sup> Interessanterweise wurde eine relativ hohe Konzentration bestimmter Osmolyte, wie Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), in Zellen von Tiefseeorganismen gefunden, von denen angenommen wird, dass sie Zellen und Proteine vor einem druckinduzierten Funktionsverlust schützen.<sup>[23,95,192,193]</sup> Daher sind hydrostatische Hochdruck (HHP)-Studien an biomolekularen Systemen Voraussetzung für das Verständnis des gegenwärtigen und evolutionär jungen Lebens in der Tiefsee, einer Umgebung, die auch der potenzielle Geburtsort des Lebens auf der Erde ist.<sup>[45,46]</sup> Bemerkenswerterweise ist nur sehr wenig über die Druckstabilität des Chaperonin-Systems und die Auswirkung von Cosoluten auf dessen Stabilität bekannt. Es ist jedoch erwiesen, dass das Expressionslevel in *E. coli* nicht nur durch Temperaturstress, sondern auch unter hohem Druck hochreguliert wird.<sup>[45,190,194]</sup> HOROWITZ *et al.* untersuchten die Dissoziation von GroEL und GroES in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> und Nukleotiden in Abhängigkeit des Drucks

unter Verwendung von Lichtstremessungen, die auf eine Dissoziation der Oligomere um 2 kbar hinwiesen.<sup>[195-197]</sup> Darüber hinaus haben verschiedene, chaotrope Cosolventien, wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid, einen negativen Einfluss auf die Stabilität beider Proteine gezeigt.<sup>[198]</sup> In dieser Studie wurde die Thermo- und Piezostabilität von GroEL, GroES und dem GroEL-GroES-Komplex in Gegenwart von Cosolventien und Salzen mittels quantitativer FTIR-Spektroskopie, ergänzt durch Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS), genauer untersucht.

## 5.2 Probenpräparation

GroEL- und GroES-Gene (von Dr. M. HAYER-HARTL und deren Arbeitsgruppe (MPI Biochemistry München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurden in pET-11a-Vektor mithilfe von Restriktionsenzymen eingefügt. Die Expressionsplasmide wurden mit Hilfe der Hitzeschockmethode in *Escherichia coli* BL21 (DE3)-Codon plus RIPL-kompetenten Zellen (Agilent Technologies) transformiert, anschließend in LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol vermehrt und über Nacht inkubiert. Nach Erreichen eines OD<sub>600 nm</sub>-Wertes von 0.5 wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellen bei 4 °C und 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in Reinigungspuffer (50 mM Tris-HCl-Puffer, pH = 7.5, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und 1 mM DTT (Dithiothreitol)) resuspendiert. Anschließend wurde der Lösung Proteaseinhibitor, DNase und Lysozym zugesetzt, sonifiziert und daraufhin bei 25000 Umdrehungen pro Minute bei 10 °C zentrifugiert. Für die Aufreinigung von GroEL wurde der Überstand in eine HiTrapQHP-Säule (GE Healthcare) überführt, mit 12 %-igem Reinigungspuffer, der 1 M NaCl enthielt, gewaschen und schließlich über 150 mL mit einem linearen Gradienten von 0 % bis 100 % eluiert (Reinigungspuffer plus 1 M NaCl). Unter Verwendung der SDS-PAGE wurde das Protein identifiziert, die Fraktionen gesammelt und der GeFi Superdex 75 26/600-Säule zugegeben, die mit Reinigungspuffer äquilibriert wurde und 250 mM NaCl enthielt. Das Protein GroEL wurde daraufhin mittels SDS-PAGE erneut identifiziert (Abbildung i-1), Fraktionen gesammelt und bei -80 °C eingefroren. Bei der Aufreinigung von GroES wurde der Überstand zu der HiTrapQHP-Säule zugegeben, mit 5 % Reinigungspuffer, der 0.5 M NaCl enthielt, gewaschen und schließlich über 150 mL mit einem linearen Gradienten von 0 % bis 100 % (Reinigungspuffer + 0.5 M NaCl) eluiert. Die Proteinreinheit wurde mittels SDS-PAGE verifiziert, die Fraktionen vereinigt und zu der

GeFi Superdex 75 26/600-Säule zugegeben, die mit Reinigungspuffer (+ 250 mM NaCl) äquilibriert wurde. Dann wurde GroES über die SDS-PAGE erneut identifiziert, Fraktionen gesammelt und bei -80 °C eingefroren.

Für den H/D-Austausch, der für die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen bei Proteinen benötigt wird, wurden GroEL und GroES mit Amicon Ultra-Zentrifugationseinheiten mit einer Porengröße von 10 kDa bzw. 5 kDa gegen D<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend lyophilisiert. Unter Berücksichtigung des Einflusses von Temperatur und Druck auf den pH-Wert wurde für die FTIR-Messungen 50 mM Phosphatbuffer bzw. 50 mM Tris-Puffer gewählt. Beide Puffer haben einen pD-Wert von 7.5, der durch Zugabe von DCl oder NaOD eingestellt wurde. Hier beschreibt Puffer A das reine Puffersystem, während Puffer B zusätzlich 100 mM KCl enthält. Alle Chemikalien wurden von Sigma Aldrich erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für die FTIR-Messungen wurden wasserfreies Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und isotopen-markierter <sup>13</sup>C-Harnstoff verwendet, um eine Überlappung der Amid-I'-Bande mit der IR-Absorption der Deformationsschwingung von H<sub>2</sub>O oder der asymmetrischen Streckschwingung des CO von Harnstoff zu vermeiden. Für die FTIR-Experimente wurde eine Proteinkonzentration von 15 mg mL<sup>-1</sup> gewählt. Informationen zur Messmethode sowie zur Analyse der FTIR-Daten können aus Kapitel 2.2.2 Experimentelles entnommen werden.

SAXS-Messungen bei Atmosphärendruck und 25 °C wurden an einer Anton Paar SAXSess mc2-Station unter Verwendung eines monochromatischen Röntgenstrahls von **MIMI GAO** durchgeführt. Hierbei wurden 20 µL mit einer Proteinkonzentration von 15 mg mL<sup>-1</sup> in die Quarzkapillare (µCell von Anton Paar) gefüllt. Das verwendete Anodenmaterial der Röntgenröhre besteht aus Kupfer, dessen K<sub>α</sub>-Strahlung ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ) mittels eines Monochromators genutzt wurde. Zur Detektion wurden *Imaging Plates* verwendet. Die Streumuster wurden über 30 Minuten pro Bild gesammelt und die Daten wurden mit 2D-SAXSquant und SAXS Quant weiterverarbeitet und analysiert. Ferner wurde der Hintergrund der Kapillare sowie des Puffers von den Daten subtrahiert und die Streukurven mit dem Streulängenprofil entschmiert. Druckabhängige SAXS-Messungen wurden an der Beamline BL9 der Synchrotronstrahlungsanlage DELTA (Dortmund) mit einer selbstgebauten Hochdruck-Probenzelle mit flachen Diamantfenstern durchgeführt.<sup>[199–201]</sup> Die Energie des Röntgenstrahls betrug 10 keV, was einer Wellenlänge von  $\lambda = 1.2 \text{ \AA}$  entspricht. Ein Bildplattendetektor (MAR345,  $d = 345 \text{ mm}$ , 100 µm Pixelgröße) wurde 15 Minuten pro Messung im jeweiligen Druckbereich von 1 bis 3500 bar bei 50 °C belichtet. Silberbehenat wurde verwendet, um den Wellenvektorübertrag  $Q$  der Rönt-

genstrahlen zu kalibrieren, der durch  $Q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta)$  gegeben ist, wobei  $\lambda$  die Wellenlänge der Röntgenstrahlen und  $2\theta$  der Streuwinkel ist. Der GroEL-GroES-Komplex (Molverhältnis 1:2) wurde frisch in 50 mM Tris-Puffer, der 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl und 3 mM ATP enthielt, hergestellt. Die erhaltenen Daten wurden mit fit2D, matlab und SAXSutilities von MIMI GAO ausgewertet.<sup>[202]</sup> Die Paar-Abstandsverteilungsfunktion  $p(r)$ , die von der Partikelform und der Verteilung der Streuzentren innerhalb der Teilchen abhängt, ist durch die indirekte FOURIER-Transformation der gemessenen Streuintensität  $I(Q)$  gegeben. Diese Funktion ermöglicht es, die Größe und Form des Streupartikels im mittleren  $Q$ -Bereich zu charakterisieren. Hierbei muss gelten, dass die Inhomogenitäten innerhalb des Teilchens klein sind. Für ein Teilchen mit gleichmäßiger Elektronendichte gilt:

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^3} \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} 4\pi Q^2 dQ \quad 5-1$$

Die Funktion  $p(r)dr$  stellt die Häufigkeit der Vektorlänge  $r$  dar, die kleine Volumenelemente innerhalb des Volumens des streuenden Teilchens, d. h. des Proteinmoleküls, mit dem maximalen Distanz,  $D_{\max}$ , verbindet, und erlaubt es, die Größe und Form des streuenden Teilchens zu charakterisieren. Die  $p(r)$ -Funktion wurde nach der Methode von SVERGUN unter Verwendung des ATSAS-Softwarepakets berechnet.<sup>[203]</sup>

### 5.3 Ergebnisse und Diskussion

SAXS-Messungen wurden durchgeführt, um die Struktur von GroEL, GroES und des gesamten Chaperonin-Systems (GroEL : GroES 1 : 2 Mol.-%) zu verifizieren (Abbildung 5-2a). Abbildung 5-2a zeigt die SAXS-Intensitätsprofile  $I(Q)$  und Abbildung 5-2b die entsprechenden Paar-Abstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  von GroEL, GroES und dem GroEL-GroES-Komplex in Gegenwart von 3 mM ATP in wässriger Pufferlösung bei 25 °C und Atmosphärendruck. Die gemessenen Streukurven stimmen mit den Literaturdaten überein<sup>[204]</sup> und bestätigen die Monodispersität der Proben, sowie deren korrekte Struktur. Die maximale Distanz im GroES-Molekül beträgt etwa 10 nm und die des GroEL-GroES-Komplexes etwa 17.5 bis 20 nm (Abbildung 5-2b,d) und ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten für den asymmetrischen Chaperonin-Komplex, von dem bekannt ist, dass er unter diesen und auch physiologischen Bedingungen vorwiegend vorliegt.<sup>[204]</sup>

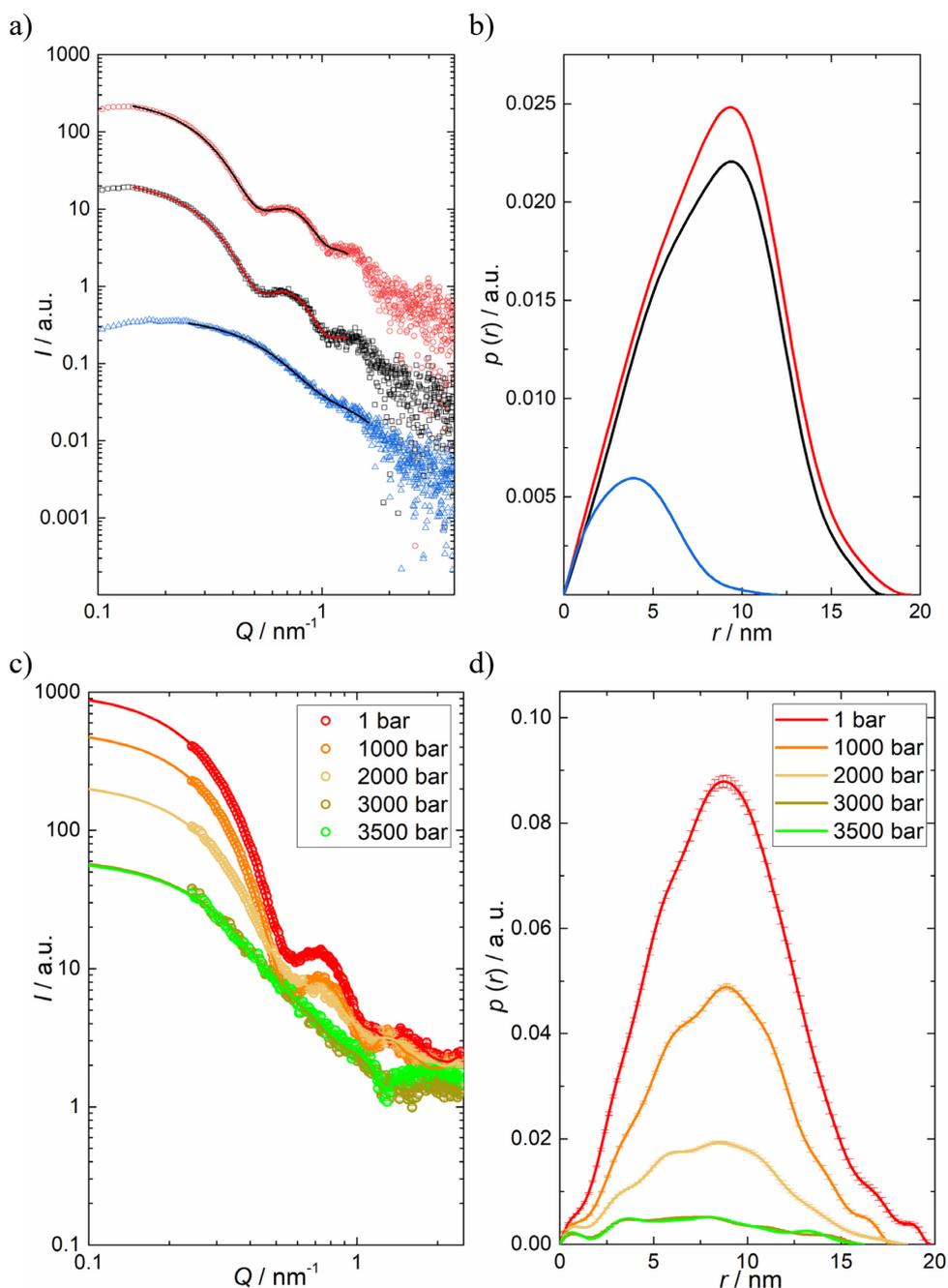


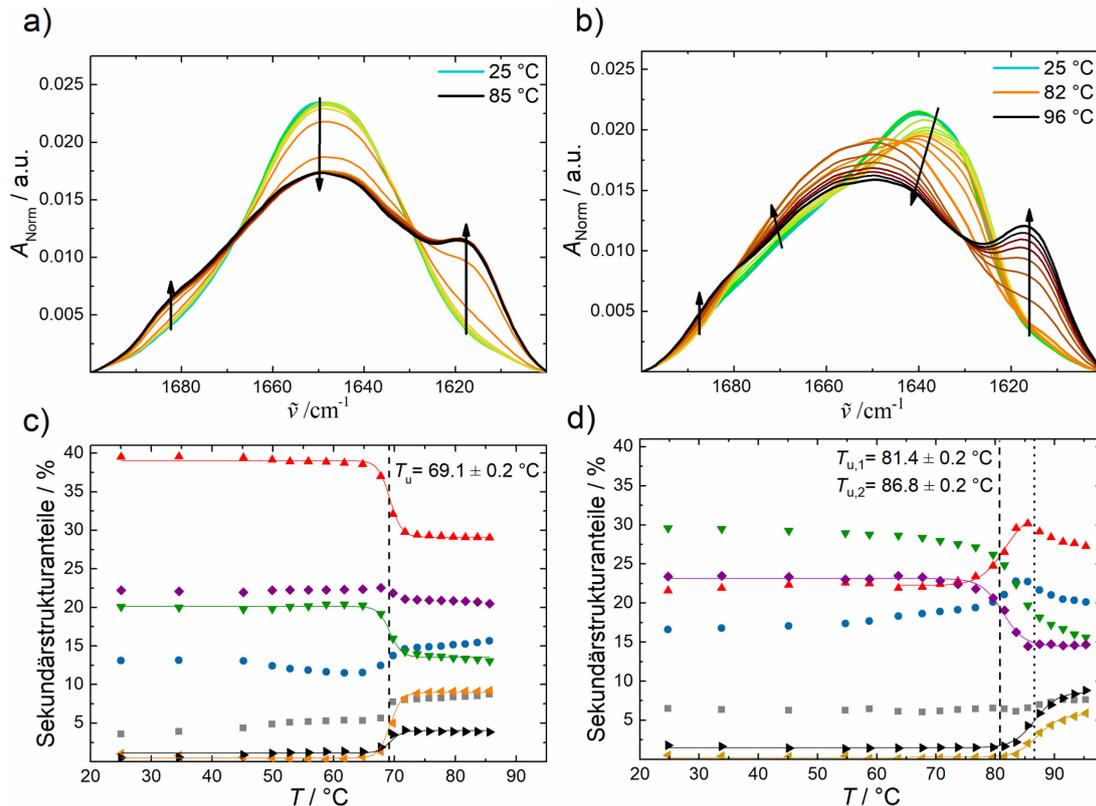
Abbildung 5-2: a) SAXS-Intensitätskurven  $I(Q)$  und b) die Paarabstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  von GroEL (15 mg mL<sup>-1</sup>, schwarz), GroES (15 mg mL<sup>-1</sup>, blau) und dem GroEL-GroES-Komplex (Molverhältnis 1:2, in Gegenwart von 3 mM ATP, rot) in wässriger Lösung (50 mM Tris-Puffer, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7.5) bei Raumtemperatur ( $T \approx 25$  °C). c) Druckabhängige SAXS-Kurven und d) die Paarabstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  des GroEL-GroES-Komplexes (GroEL: 25 mg mL<sup>-1</sup> und GroES: 4.5 mg mL<sup>-1</sup>) in wässriger Lösung (50 mM Tris-Puffer, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7.5). Kreisförmige Symbole repräsentieren experimentelle Daten und durchgezogene Linien in a) sind Fits, die die FOURIER-Transformationen von  $p(r)$  darstellen. Aufgrund der starken Hintergrundstreuung durch die Hochdruckzelle und des kleinen  $Q$ -Bereichs erscheinen die  $p(r)$ -Daten in (d) im Vergleich zu denen in den Quarzkapillaren bei 25 °C und Atmosphärendruck gemessenen etwas verrauscht (b).

Abbildung 5-2c zeigt die SAXS-Profile des GroEL-GroES-Komplexes in Gegenwart von 3 mM ATP sowie in Abhängigkeit des hydrostatischen Drucks und Abbildung 5-2d die entsprechenden Paarabstandsverteilungsfunktionen,  $p(r)$ . Wie deutlich zu erkennen ist, werden für die Form des Chaperonin-Komplexes die typischen Minima der  $I(Q)$ -Kurve bei einer Kompression über 2 kbar hinaus weniger ausgeprägt und verschwinden schließlich bei 3.5 kbar. Die damit einhergehende Abnahme der Streuintensität mit zunehmendem Druck ist auf eine druckinduzierte Abnahme des Elektronendichtekontrasts zwischen Probe und Lösungsmittel zu erklären, die auf einen drastischen Anstieg der Elektronendichte des Wassers bei hohen Drücken zurückzuführen ist. Die in der  $p(r)$ -Funktion beobachteten deutlichen Änderungen deuten auf eine Dissoziation des GroEL-GroES-Komplexes bei Drücken über etwa 2 kbar hin, was mit den Schlussfolgerungen auf der Grundlage indirekter Messungen unter Verwendung der Lichtstreuung vereinbar ist.<sup>[197]</sup> Selbst oberhalb von 3.5 kbar wird keine vollständige Dissoziation in Monomere beobachtet, wie aus der Steigung von  $I(Q)$  und der Form der  $p(r)$ -Funktion abgeleitet werden kann, die Rückschlüsse auf erweiterte 2D-Arrays von Proteinanordnungen zulassen.

Um Aussagen über die Sekundärstrukturänderungen des Chaperonin-Systems über einen weiten Temperatur- und Druckbereich treffen zu können, wurde die FTIR-Spektroskopie eingesetzt. Abbildung 5-3 zeigt den Temperatureinfluss auf die Amid-I'-Bande von GroEL und GroES im reinem Puffersystem und die entsprechenden Veränderungen der Sekundärstrukturanteile. Details der Zuordnung und Bandenanpassung zur Bestimmung der verschiedenen Sekundärstrukturelemente sind in Abbildung i-2 dargestellt. Die normierte Amid-I'-Bande von GroEL in Abhängigkeit der Temperatur (Abbildung 5-3a) zeigt eine breite Bande bei  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ , die mit steigender Temperatur abnimmt, während zwei neue Peaks bei  $\sim 1618 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $\sim 1683 \text{ cm}^{-1}$  auftreten. Diese beiden Banden sind für die Aggregation bei der Entfaltung von Proteinen bei hoher Temperatur charakteristisch und können den intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern zugeordnet werden. Basierend auf dem Anpassungsverfahren liegen die wichtigsten sekundären Strukturkomponenten ( $\alpha$ -Helices:  $\sim 39 \%$ , intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter:  $\sim 23 \%$ ) bei 25 °C und Atmosphärendruck in ziemlich guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten.<sup>[205]</sup> Die beobachteten kleinen Abweichungen, wie z. B. im Vergleich zu den kristallographischen Daten von BRAIG *et al.*<sup>[206]</sup>, können eventuell auf unterschiedliche Absorptionskoeffizienten der Sekundärstrukturelemente zurückgeführt werden. Hier werden hauptsächlich die relativen Änderungen betrachtet und diskutiert. Die Amid-I'-Bande zeigt keine

signifikanten Veränderungen zwischen 25 °C und 65 °C. Oberhalb von 65 °C beginnt die thermische Entfaltung von GroEL, die mit einer Abnahme der Anteile an  $\alpha$ -Helices ( $\sim -10\%$ ) und ungeordneten Strukturen ( $\sim -7\%$ ) und Zunahme der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim +13\%$ ) einhergeht. Mithilfe des BOLTZMANN-Fits (Gl. 2-10) konnte die Entfaltungstemperatur und die VAN'T HOFF-Enthalpieänderung bei (teilweiser) Entfaltung des Proteins ermittelt werden ( $T_u = 69.1 \pm 0.2$  °C;  $\Delta H^\circ_{\text{vH,u}} = 1000 \pm 60$  kJ mol<sup>-1</sup>). Die Entfaltungstemperatur stimmt mit den Ergebnissen der Literatur überein, die angibt, dass die Denaturierung von GroEL zwischen 65 und 70 °C auftritt.<sup>[207]</sup> Der  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ -Wert ist jedoch wegen der Irreversibilität der hitzeinduzierten Proteinentfaltung und des anschließenden Aggregationsprozesses mit Vorsicht zu behandeln. Das heißt, er gibt keine wahren thermodynamischen Daten wieder und dient nur zum Vergleich mit den ermittelten  $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ -Werten in Gegenwart verschiedener Salze, Nukleotide und Cosolventien (Tabelle i-5).

Im Gegensatz zu GroEL zeigt die normierte Amid-I'-Bande von GroES eine breite Bande bei  $\sim 1640$  cm<sup>-1</sup> (Abbildung 5-3b), was auf eine unterschiedliche Verteilung der Sekundärstrukturelemente hinweist. Bei steigender Temperatur wird vor der Aggregation einerseits eine Abnahme des Hauptpeaks und andererseits ein deutlicher Strukturübergang beobachtet (dies ist in Abbildung 5-3b durch den Übergang von türkis nach orange gekennzeichnet). Die Aggregation selbst wird wiederum durch das Auftauchen der Peaks der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter angezeigt wird, die bei  $\sim 1617$  cm<sup>-1</sup> bzw.  $\sim 1684$  cm<sup>-1</sup> erscheinen.



**Abbildung 5-3:** Temperaturabhängige FTIR-Absorptionsdaten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei Atmosphärendruck. a) Temperaturabhängige Änderungen des normierten Amid-I'-Bandenbereichs von GroEL und c) entsprechende Änderungen der Sekundärstrukturelemente: intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1683\text{ cm}^{-1}$ , grau); Schleifen ( $1672\text{ cm}^{-1}$ , blau);  $\alpha$ -Helices ( $1654\text{ cm}^{-1}$ , rot); ungeordnete Strukturen ( $1642\text{ cm}^{-1}$ , grün); intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1636\text{ cm}^{-1}$ , violett); intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1618\text{ cm}^{-1}$ , orange) und Seitenketten ( $1612\text{ cm}^{-1}$ , schwarz). b) Druckabhängige Änderungen des normierten Amid-I'-Bandenbereichs von GroES und d) entsprechende Änderungen der Sekundärstrukturelemente: intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1685\text{ cm}^{-1}$ , grau); Schleifen ( $1672\text{ cm}^{-1}$ , blau);  $\alpha$ -Helices ( $1654\text{ cm}^{-1}$ , rot); ungeordnete Strukturen ( $1641\text{ cm}^{-1}$ , grün); intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1630\text{ cm}^{-1}$ , violett); intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1618\text{ cm}^{-1}$ , orange) und Seitenketten ( $1612\text{ cm}^{-1}$ , schwarz). Linien zeigen die BOLTZMANN-Anpassung an die experimentellen Daten unter Verwendung von Gl. 2-10.

GroES weist bei  $25\text{ °C}$  und Umgebungsdruck einen hohen Gehalt an Zufallsknäuel ( $\sim 29\%$ ) und intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim 23\%$ ) auf, wohingegen der Anteil der  $\alpha$ -Helices viel geringer ist als bei GroEL. VALENCIA *et al.* berichteten über ähnliche Werte für die Sekundärstrukturelemente.<sup>[208]</sup> In dem Temperaturbereich von  $25\text{ °C}$  bis  $70\text{ °C}$  weist die Sekundärstruktur von GroES keine signifikante Änderung auf. Oberhalb von  $70\text{ °C}$  findet ein Strukturübergang statt, bei dem intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter aufgelöst und  $\alpha$ -Helices gebildet werden. Die Aggregation des Proteins beginnt bei  $\sim 82\text{ °C}$ , wobei der prozentuale Anteil der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter auf  $7\%$  ansteigt, während der prozentuale Anteil an  $\alpha$ -Helices leicht

abnimmt ( $\sim -4\%$ ). Im Verlaufe des gesamten Phasenübergangs wird eine kontinuierliche Abnahme der ungeordneten Strukturen ( $\sim -12\%$ ) beobachtet. Die Temperaturen der beiden Strukturübergänge liegen bei  $T_{u,1} = 81.4 \pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$ , bzw.  $T_{u,1} = 86.8 \pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$ . Somit weist GroES eine um etwa  $12\text{ }^\circ\text{C}$  höhere Temperaturstabilität als GroEL auf. Wie von BOUDKER *et al.* gezeigt wurde, scheint die Stabilität von GroES konzentrationsabhängig zu sein, da mit zunehmender Proteinkonzentration der  $T_u$ -Wert ansteigt.<sup>[209]</sup> DSC- und CD-Untersuchungen ergaben bei einer GroES-Konzentration von  $175\text{ }\mu\text{M}$  einen  $T_u$ -Wert von etwa  $76\text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>[188]</sup> Bei den FTIR-Untersuchungen wurde eine Konzentration von etwa  $1.44\text{ mM}$  verwendet.

Abbildung 5-4 stellt den Einfluss des Drucks auf die Amid-I'-Bande und auf die Sekundärstrukturanteile von GroEL und GroES dar, die aus der Analyse der darunterliegenden Subbanden abgeleitet wurden (Abbildung i-3). Beide Proteine wurden im Druckbereich von  $1\text{ bar}$  bis  $10000\text{ bar}$  ( $1\text{ GPa}$ ) vermessen. Die Amid-I'-Bande von GroEL verschiebt sich mit zunehmendem Druck zu niedrigeren Wellenzahlen (Abbildung 5-4a). Diese druckinduzierte elastische Verschiebung lässt sich durch eine druckinduzierte Kompression der chemischen Bindungen erklären, die äquivalent zu Änderungen der Kraftkonstante der C=O-Streckschwingung ist. Bezüglich des prozentualen Anteils der Sekundärstrukturelemente wird mit steigendem Druck eine leichte Abnahme des  $\alpha$ -Helices-Anteils ( $\sim -5\%$ ) beobachtet, während der Anteil der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim +5\%$ ) oberhalb von einem  $k\text{bar}$  ansteigt. Bis zu  $10\text{ kbar}$  findet nur diese geringfügige Konformationsänderung statt, die mit einer Volumenänderung von  $-9 \pm 3\text{ mL mol}^{-1}$  (Gl. 2-11) verbunden ist. Die Druckabhängigkeit der Amid-I'-Bande und die relativen Änderungen der Sekundärstrukturelemente des GroEL-GroES-Komplexes ähneln denen von GroEL (Abbildung i-4).

Die Änderungen der Sekundärstruktur in Abhängigkeit des Drucks von GroES unterscheidet sich signifikant von der von GroEL. GroES entfaltet teilweise bei einem  $p_u$ -Wert von  $5.4 \pm 0.3\text{ kbar}$ , was mit einem Anstieg der  $\alpha$ -Helices ( $\sim +4\%$ ) einhergeht, während der Anteil der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim -5\%$ ) (Abbildung 5-4d) bei Kompression gleichzeitig abnimmt. Mittels Gl. 2-11 konnte für GroES eine Volumenänderung  $-53 \pm 3\text{ mL mol}^{-1}$  bestimmt werden. Dieser Wert ist typisch für  $\Delta V_u$ -Werte, die für eine Entfaltung von monomeren Proteinen in der Literatur berichtet wurden.<sup>[94,107,174,210]</sup>

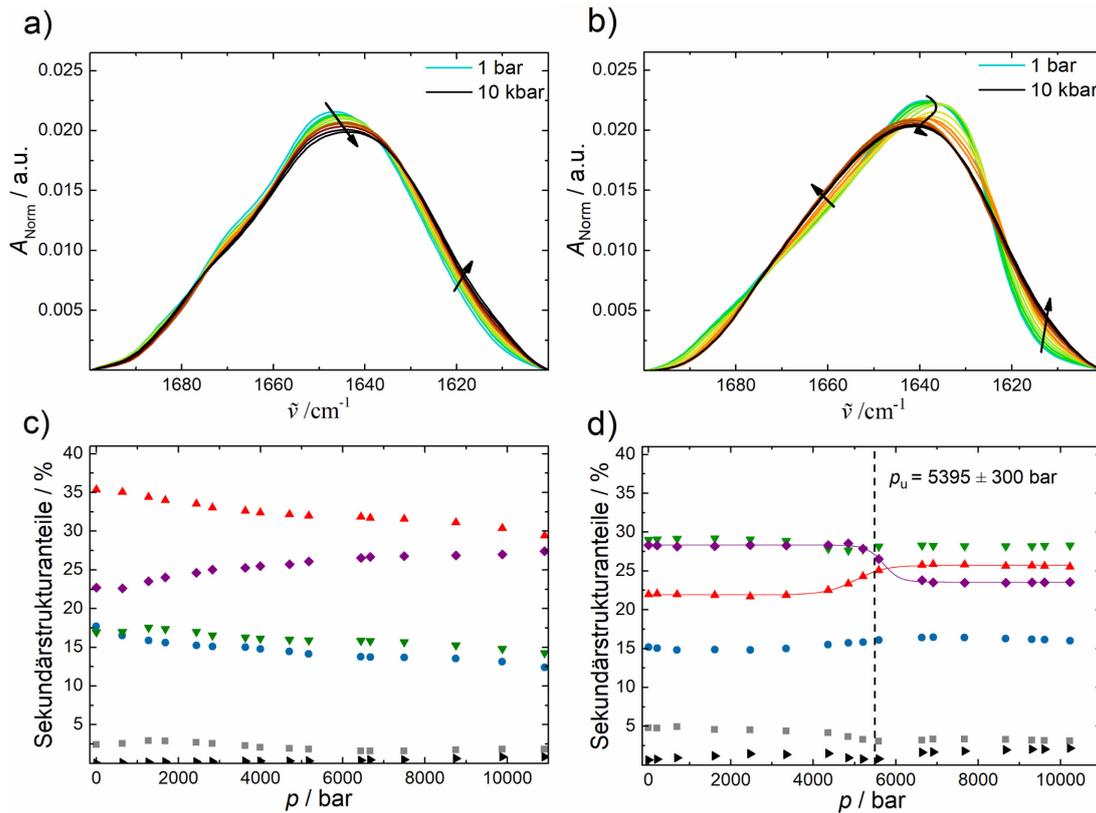


Abbildung 5-4: Druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei 25 °C.

a) Druckabhängige Änderungen des normierten Amid-I'-Bandenbereichs von GroEL und c) entsprechende Änderungen der Sekundärstrukturelemente: intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ , grau); Schleifen (1672  $\text{cm}^{-1}$ , blau);  $\alpha$ -Helices (1654  $\text{cm}^{-1}$ , rot); ungeordnete Strukturen (1642  $\text{cm}^{-1}$ , grün); intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1636  $\text{cm}^{-1}$ , violett) und Seitenketten (1612  $\text{cm}^{-1}$ , schwarz). b) Temperaturabhängige Änderungen des normierten Amid-I'-Bandenbereichs von GroES und d) entsprechende Änderungen der Sekundärstrukturelemente: intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1685  $\text{cm}^{-1}$ , grau); Schleifen (1671  $\text{cm}^{-1}$ , blau);  $\alpha$ -Helices (1654  $\text{cm}^{-1}$ , rot); ungeordnete Strukturen (1641  $\text{cm}^{-1}$ , grün); intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1630  $\text{cm}^{-1}$ , violett) und Seitenketten (1612  $\text{cm}^{-1}$ , schwarz). Linien zeigen die BOLTZMANN-Anpassung an die experimentellen Daten unter Verwendung von Gl. 2-11.

Durch die Bevorzugung von Zuständen mit einem kleineren partiellen molaren Volumen verschiebt der Druck, gemäß dem Prinzip von LE CHÂTELIER, das Gleichgewicht in Richtung des Zustands mit dem kleineren Gesamtvolumen. Aufgrund der Tatsache, dass die Druckstabilität von Proteinen im Allgemeinen und von oligomeren Proteinen im Besonderen hauptsächlich auf deren inneres Hohlraumvolumen und Packungsdefekte zurückzuführen ist, die sich bei der Entfaltung mit Wasser füllen<sup>[174]</sup>, kann geschlossen werden, dass die Packung der beiden Proteine bei Raumtemperatur unterschiedlich ist. Der Unterschied ist jedoch sehr gering und mit dem Volumen von nur 2-3 Wassermolekülen vergleichbar. GroEL weist geringe Konformationsänderungen auf, wobei der Anteil der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter auf Kosten von  $\alpha$ -Helices

geringfügig zunimmt, die mit einem kleinen  $\Delta V_u$ -Wert von  $-9 \text{ mL mol}^{-1}$  einhergehen. GroES hingegen toleriert Drücke bis ungefähr 5.4 kbar, wo die partielle Entfaltung des Proteins einsetzt und eine Volumenänderung von  $-53 \text{ mL mol}^{-1}$  auftritt.

Kationen, Nukleotide und Osmolyte haben sich als wichtig für die Aufrechterhaltung des Reaktionszyklus des Chaperonin-Systems und für die Regulierung des osmotischen Drucks erwiesen.<sup>[211,212]</sup> Daher wurden Studien über die Auswirkungen von Salzen, ATP, ADP, TMAO und Harnstoff auf die Thermo- und Piezostabilität von GroEL, GroES und dem GroEL-GroES-Komplex mithilfe der FTIR-Spektroskopie in unsere Untersuchungen einbezogen. Alle erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5-5 dargestellt und in der Tabelle i-5 aufgeführt.

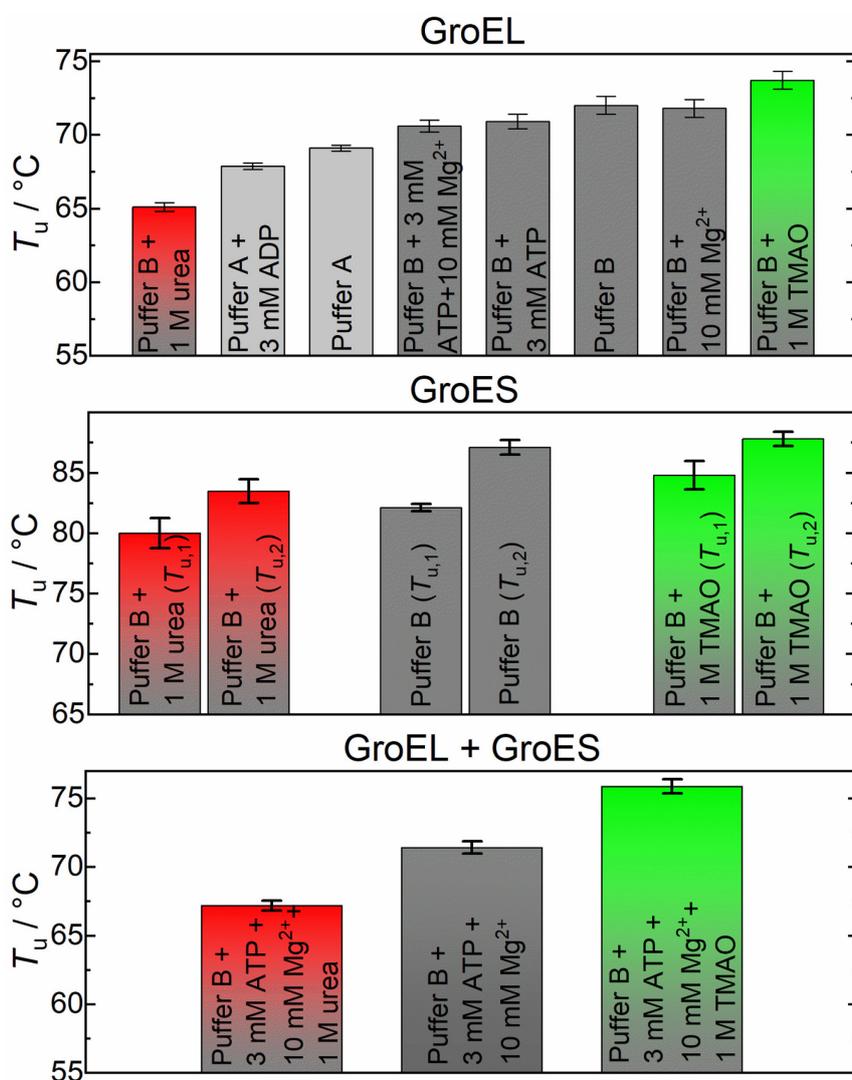


Abbildung 5-5: Spektroskopisch bestimmte Entfaltungstemperaturen,  $T_u$ , von GroEL, GroES und des gesamten Komplexes bei Atmosphärendruck in Ab- und Anwesenheit verschiedener Salzionen, Nukleotide und Cosolventien (urea = Harnstoff). Puffer A beschreibt hier das reine Puffersystem, während Puffer B zusätzlich 100 mM KCl enthält.

In Gegenwart von 100 mM  $K^+$  (Puffer B) und zusätzlich 1 M TMAO verschiebt sich die Entfaltungstemperatur von GroEL signifikant zu höheren Temperaturen ( $\Delta T_u \approx 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), d. h. die Cosolute erhöhen die Stabilität des Proteins. Die Zugabe des Nukleotids ADP (3 mM) und die Zugabe von Harnstoff (1 M) zeigen den gegenteiligen Effekt. Anders verhält es sich bei GroES, bei dem keine signifikanten Veränderungen des  $T_u$ -Wertes in Gegenwart der verwendeten Salze und Nukleotide auftreten. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Entfaltungstemperatur von GroES stark von den Cosolventien TMAO und Harnstoff abhängt, die sich ebenfalls positiv (1 M TMAO) oder negativ (1 M Harnstoff) auf die Temperaturstabilität des Proteins auswirken. Interessanterweise wird die Stabilität von GroEL auch durch Zugabe von GroES sowohl in Abwesenheit, welche in guter Übereinstimmung mit der Literatur ist<sup>[188]</sup>, als auch in Gegenwart von Cosolventien verbessert (Abbildung 5-5a,c), Die spektroskopisch bestimmten VAN´T HOFF-Enthalpieänderungen (siehe Tabelle i-5) werden durch die Zugabe von Salzen, Nukleotiden und TMAO nicht signifikant beeinflusst. Die Effekte von Nukleotiden und Salzen auf die Thermostabilität von reinem GroEL stimmen gut mit den Daten überein, die aus den *differential scanning calorimetry*-Messungen von SURIN *et al.* hervorgehen.<sup>[188]</sup> Der destabilisierende Einfluss des Nukleotids kann durch die Konformationsänderungen im offenen Zustand der GroEL-Untereinheit erklärt werden, die wahrscheinlich in der Nähe der Nukleotidbindungsstelle auftreten.<sup>[213,214]</sup> Auch Harnstoff wirkt sich negativ auf die Stabilität aus, was höchstwahrscheinlich auf direkte Wechselwirkungen der Harnstoffmoleküle mit dem Proteinrückgrat und seinen Seitenketten resultiert. Somit wird der entfaltete Zustand energetisch begünstigt und relativ zur nativen Konformation stabilisiert.<sup>[215,216]</sup> TMAO dagegen kann die Proteinstabilität ohne direkte Wechselwirkung mit dem Protein verbessern. Es verhindert die Entfaltung durch günstige Wechselwirkung mit Wasser, was zu einer erhöhten Wasserstoffbindung und Strukturierung des Lösungsmittels führt.<sup>[94,114]</sup> Der *excluded volume* Effekt von TMAO führt zu einer Erhöhung der Stabilität gefalteter und kompakter Strukturen.<sup>[25,114]</sup> Das Vorhandensein von  $K^+$ -Ionen sowie GroES wirken sich ebenfalls positiv auf die Temperaturstabilität von GroEL aus. Beide Faktoren stabilisieren die Quartärstruktur von GroEL. GroES interagiert mit der apikalen Domäne von GroEL<sub>197-376</sub> und löst eine Konformationsänderung aus.<sup>[198,217,218]</sup>  $K^+$ - und  $Mg^{2+}$ -Ionen spielen auch eine wichtige Rolle für die ATP-Bindung und -Hydrolyse und beeinflussen die Stabilität von GroEL.<sup>[219–221]</sup>

Die temperaturinduzierte Entfaltung von Proteinen ist hauptsächlich getrieben durch den Konformationsentropiegewinn der Peptidkette, wobei die Gesamtvolumenänderung den entscheidenden Part im druckinduzierten Entfaltungsszenario spielt.<sup>[97,210]</sup> Das System neigt dazu, bei

hohem Druck einen Zustand mit kleinerem Volumen einzunehmen, was die Füllung und Eliminierung des inneren Hohlraumvolumens und der Hohlräume als möglichen Mechanismus für die druckinduzierte Entfaltung beinhaltet.<sup>[96,174,210]</sup> Die thermodynamischen Daten für GroES in Gegenwart der beiden untersuchten Cosolventien im Vergleich zu den reinen Pufferdaten sind in Abbildung 5-6 und Tabelle i-6 dargestellt. Innerhalb der Genauigkeit des Experiments hat 1 M TMAO keinen signifikanten Einfluss auf  $p_u$  und  $\Delta V_u$ . Ein ähnliches Verhalten wurde bei GroEL beobachtet. Anders verhält es sich mit den Effekten des TMAO auf einige monomere Proteine (z. B. SNase, RNase A). Bekannt sind unter anderem Stabilisierungen gegenüber druckinduzierter Entfaltung und eine Veränderung der Enzymaktivität, Proteinpolymerisation und Kanalaktivität.<sup>[22,94,98,139,210,222–225]</sup> Der hier beobachtete geringfügige (möglicherweise stabilisierende) Effekt ist wahrscheinlich auf einen geringeren Grad an Entfaltung und der Vergrößerung der Oberfläche, die dem Lösungsmittel ausgesetzt ist (SASA), zurückzuführen, wodurch der durch TMAO erzeugte, ausgeschlossene Volumeneffekt weniger wirksam ist.

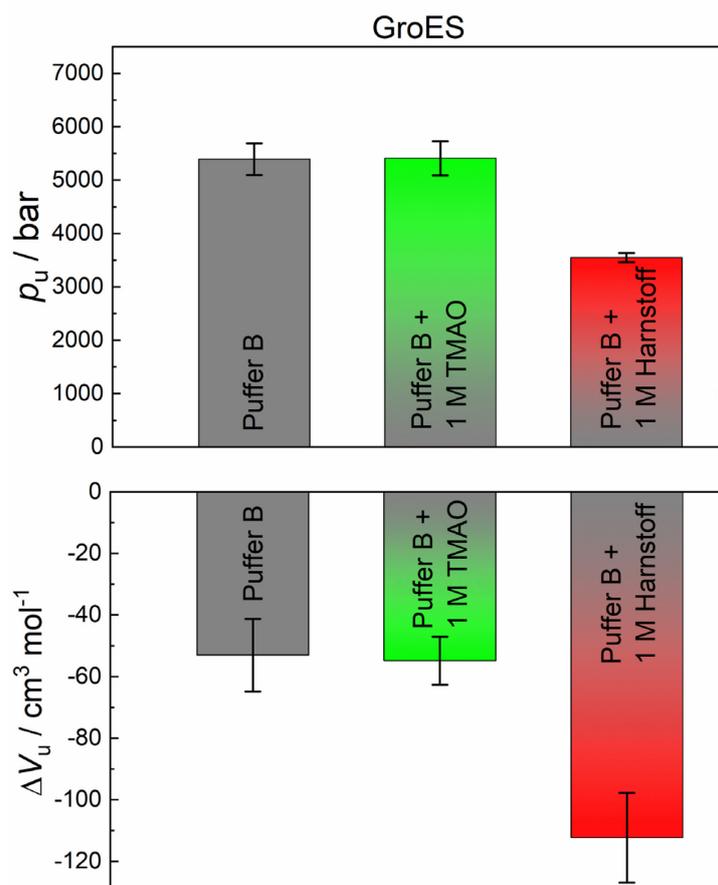


Abbildung 5-6: Spektroskopisch ermittelte Entfaltungsdrücke,  $p_u$ , und Volumenänderungen,  $\Delta V_u$ , von GroES bei 25 °C in Ab- und Anwesenheit von Cosolventien.

Der marine Osmolyt TMAO wurde als potenzieller Piezolyt diskutiert, der in der Lage ist, den stoffwechselstörenden Druckeffekten bei vielen Tiefsee-Wirbeltieren (z. B. Chondrichthyanen, wie Haie oder Rochen, Teleostfischen und Krebstieren) zu kompensieren, sowie zusätzlich die Fähigkeit besitzt, den destabilisierenden Effekten von Harnstoff entgegenzuwirken.<sup>[22,95]</sup> In wirbellosen Tiefseetieren enthalten Zellen einen hohen Anteil an neutralen, freien Aminosäuren und einigen anderen Methylaminen,<sup>[21]</sup> die unterschiedliche, cytoprotektive Eigenschaften gegen Umweltstressoren aufweisen. Beispielsweise scheint Hypotaurin die Zellen als Antioxidans vor Sulfidtoxizität zu schützen.<sup>[23]</sup> Glycin scheint, im Vergleich zu TMAO, Proteine im Wesentlichen gegen temperaturbedingten Stress zu stabilisieren.<sup>[22]</sup>

Umgekehrt nimmt  $p_u$  in Gegenwart von 1 M Harnstoff deutlich ab ( $\sim 1800$  bar) und folglich ist  $\Delta V_u$  im Vergleich zum cosolvensfreien Puffer (Puffer B) sichtlich negativer. Es wird erwartet, dass die druckinduzierte Destabilisierung von Harnstoff auf günstige enthalpische Wechselwirkungen des Moleküls mit dem Protein zurückzuführen ist, die zu deutlichen Konformationsänderungen führen. Sie können zu einer Zunahme des Hohlraumvolumens und/oder einer Zunahme der elektrostriktiven Hydratation einer größeren exponierten SASA bei (teilweiser) Entfaltung und damit zu dem negativeren, beobachteten  $\Delta V_u$ -Wert führen.

## 5.4 Zusammenfassung

Das Chaperonin-System GroEL-GroES ist in allen Lebensbereichen vorhanden und schützt Proteine vor Aggregation und fehlerhafter Faltung. Als Antwort auf einen Stresszustand, wie hohe Temperaturen und Drücke, wird die Produktion von Hitzeschockproteinen wie dem GroEL-GroES-System gesteigert.<sup>[46,194,226]</sup> Dazu wurde die Thermo- und Piezostabilität von GroEL, GroES und des GroEL-GroES-Komplexes in einem großen Bereich der Temperatur-Druck-Ebene untersucht. Außerdem wurden die Auswirkungen bestimmter Cosolventien, Nucleotide und Salze mithilfe der quantitativen FTIR-Spektroskopie, die mit SAXS-Messungen komplementiert wurden, erforscht. Aufgrund der hohen biologischen Relevanz und mangelnder Daten lag der Fokus insbesondere auf dem Einfluss des Drucks auf das Chaperoninsystem. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass der GroEL-GroES-Komplex mit einer Entfaltungstemperatur von über  $70$  °C, die durch kompatible Cosolute wie TMAO noch leicht erhöht werden kann, besonders temperaturstabil ist. Umgekehrt ist die Druckstabilität von GroEL und damit des GroEL-GroES-Komplexes eher begrenzt und viel geringer als die von monomeren Proteinen, die sich typischerweise erst jenseits von Drücken von 4 bis 8 kbar entfalten.<sup>[46,95]</sup>

Während GroES bis zu etwa 5.5 kbar stabil ist, bevor es sich teilweise entfaltet, unterliegt GroEL und damit auch der GroEL-GroES-Komplex bereits oberhalb von 1 kbar geringfügigen Konformationsänderungen, die einen dissoziationsinduzierten Konformationsdrift auslösen, was zu einer leichten Abnahme des  $\alpha$ -Helix-Anteils und einer gleichzeitigen Zunahme der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter führt. Die Hochdruck-SAXS-Daten bestätigen die Schlussfolgerungen aus den FTIR-Daten, die eine Dissoziation des Komplexes bei etwa 2 kbar zeigen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Lichtstreuexperimenten von HOROWITZ *et al.*, die eine Dissoziation des Systems bei Drücken um 2 kbar nahelegen und eine sehr langsame Reassoziation des Komplexes (Halbwertszeit:  $\sim 150$  h) andeuten, was möglicherweise mit dem Konformationsdrift der Struktur bei der Dissoziation des Komplexes erklärt werden kann.<sup>[227]</sup> Ferner zeigen die FTIR-Daten überraschenderweise, dass selbst bis zu 10 kbar keine signifikante Entfaltung von GroEL beobachtet wird, d. h. die Untereinheiten sind selbst sehr druckstabil. Die bis zu 3.5 kbar gemessenen SAXS-Daten zeigen auch, dass keine vollständige Dissoziation in die kleinen monomeren Untereinheiten und keine Entfaltung der Monomere stattfindet. Die Anreicherung bestimmter Cosolute, wie Methylamine, Polyole und Aminosäuren, findet sich häufig in Zellen wieder, um den zellulären osmotischen Druck auszugleichen und die Stabilität und Funktionalität von Proteinen und deren Anordnungen aufrechtzuerhalten.<sup>[23,94,95,192,193]</sup> Daher werden solche kleinen organischen Moleküle als Osmolyte oder chemische Chaperone bezeichnet. Ein prominenter und wirksamer Osmolyt, Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), kommt sogar im Gewebe verschiedener Tiefseeorganismen vor und dessen Konzentration korreliert mit der Meerestiefe in der diese Organismen angetroffen wurden und somit dem hydrostatischen Druck.<sup>[22,23,95]</sup> Hier wurde gezeigt, dass 1 M TMAO in der Lage ist, die Temperaturstabilität der Proteine geringfügig zu erhöhen, wobei die Druckstabilität jedoch kaum durch die Cosolute beeinflusst wird, was möglicherweise auf das Fehlen einer signifikanten Entfaltung der Untereinheiten zurückgeführt werden kann. Insgesamt ist der GroEL-GroES-Komplex daher eher temperaturstabil und resistent gegenüber hohen, hydrostatischen Druck im Bereich von 1 bis 1 bar, ab dem die Dissoziation des GroEL-GroES-Komplexes erst beginnt. Somit ist das Chaperonin-System nur in dem Druckbereich stabil, dem das Leben auf der Erde ausgesetzt ist, einschließlich der tiefsten Gräben des Ozeans.

## **6. Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des ArgBP *Thermotoga maritima* und seiner gefalteten Fragmente**

### 6.1 Einleitung

Ein bemerkenswerter großer Anteil der Proteine bildet oligomere Anordnungen, in denen eine oder mehrere Polypeptidketten assoziieren.<sup>[228,229]</sup> Diese Neigung ist so stark, dass eine Oligomerisierung sowohl in physiologischen als auch im pathologischen Zustand beobachtet wird. In der Tat kann die Tendenz des Proteins zur Selbstorganisation unkontrolliert vonstattengehen und schädliche Spezies erzeugen, die schwerwiegende Krankheiten verursachen können.<sup>[141]</sup> Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Aufklärung der Mechanismen, die zur Oligomerisierung führen und die Analyse der strukturellen Eigenschaften der multimeren Assemblierungen seit den Anfängen der Strukturbiologie stets aktive, wissenschaftliche Gebiete sind. Der Domänen-austausch ist ein besonders faszinierender Mechanismus der Oligomerisierung, bei dem die Assemblierung durch den gegenseitigen Austausch von Domänen oder Sekundärstrukturelementen zwischen zwei oder mehr Untereinheiten erzeugt wird.<sup>[230]</sup> Diese Anordnung wird durch Wechselwirkungen, die zwischen dem Austauschelement und dem Rest des Proteins, das sich ebenfalls im monomeren Zustand befindet (geschlossene Grenzfläche), und durch Wechselwirkungen, die bei der Bildung des Oligomers entstehen (offene Grenzfläche), stabilisiert. Substratbindende Proteine (SBP) bilden eine große Protein-Superfamilie, die mit Membranproteinen für den effizienten Transport von Metaboliten und für die Signaltransduktion kooperieren.<sup>[231]</sup> Bei dieser Art von Proteinen werden durch die Bindung und die Freisetzung des Substrats im Allgemeinen große Tertiärstrukturveränderungen induziert, die den in der Venusfliegenfalle beobachteten Bewegungen ähneln. Unter den SBP weist das aus *Thermotoga maritima* isolierte Arginin-Bindungsprotein (ArgBP) eine Reihe von charakteristischen Eigenschaften auf. Insbesondere ist ArgBP im Gegensatz zu den anderen monomeren SBP dimer. Darüber hinaus besitzt dieses Protein eine bemerkenswerte thermische und chemische Stabilität. Tatsächlich liegt die Entfaltungstemperatur von ArgBP bei etwa 114 °C und ist gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln stabil, da ArgBP erst bei 70 °C in Gegenwart von 4 M Guanidiniumchlorid entfaltet.<sup>[232]</sup> Interessanterweise gilt die außergewöhnliche Stabilität auch für den oligomeren Zustand des Proteins, da die vollständige Dissoziation des Dimers hohe Tempera-

turen sowie SDS und Harnstoff in hohen Konzentrationen erfordert.<sup>[233]</sup> Anhand der kristallographischen Struktur des Proteins (ArgBP<sup>20-246</sup>) konnte ermittelt werden, dass die ArgBP-Dimersierung durch den Austausch der C-terminalen Helix zwischen den beiden Untereinheiten erfolgt (Abbildung 6-1).<sup>[233]</sup> Der Vergleich des Arginin-gebundenen und des ligandfreien Zustands des Proteins hat gezeigt, dass der Domänen austausch auch mit Proteinen assoziiert sein kann, die wichtige tertiäre Strukturübergänge durchlaufen.<sup>[233,234]</sup>

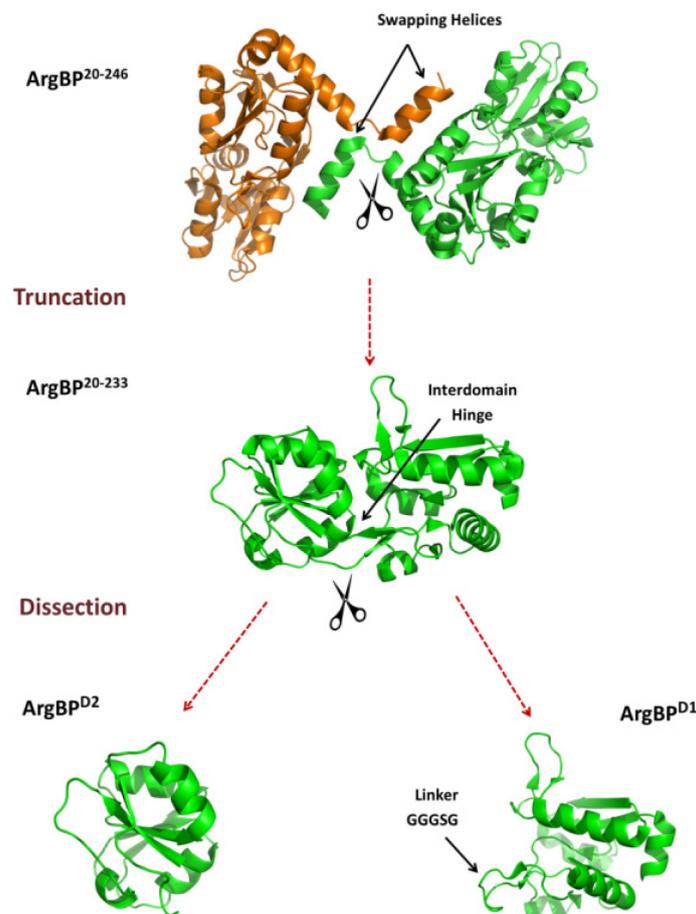


Abbildung 6-1: Strukturelle Darstellung der in der vorliegenden Studie charakterisierten ArgBP-Varianten. Die für die Cartoons verwendeten Proteindatenbankcodes sind: 4 PSH, 6GGV, 6GPC und 6GPM für ArgBP<sup>20-246</sup>, ArgBP<sup>20-233</sup>, ArgBP<sup>D1</sup> bzw. ArgBP<sup>D2</sup>.

Die bemerkenswerte Stabilität des Proteins ließ größere Manipulationen zu, die den nativen Zustand des Proteins und seiner abgewandelten Formen nicht beeinträchtigen (Abbildung 6-1). Dazu gehört eine verkürzte bzw. monomere Form des Proteins, bei der die im Dimer austauschte C-terminale Helix deletiert wurde.<sup>[235]</sup> Außerdem konnte die verkürzte Form weiter zerlegt werden, um die einzelnen ArgBP-Domänen zu charakterisieren: ArgBP<sup>D1</sup> (AS-

Reste 20-114 und 207-231, verbunden durch ein GGGGSG-Segment) und ArgBP<sup>D2</sup> (AS-Reste 115-206).<sup>[236]</sup> Darüber hinaus wurde das Protein umfassend mutiert, wobei verschiedene Varianten (i) unterschiedliche oligomere Zustände (Monomere, Dimere und Trimere) einnehmen,<sup>[237,238]</sup> (ii) formal nach RAMACHANDRAN verbotene Konformationen (ArgBP<sup>G52V</sup>, ArgBP<sup>G52A</sup>)<sup>[239]</sup> erzeugt wurden oder (iii) *ad hoc* für Epitop-Präsentationen oder Argininerkennung funktionalisiert wurden.<sup>[240]</sup>

In dieser Studie wurde die Druckstabilität des Proteins untersucht. Das Interesse an der Untersuchung der Druckabhängigkeit von biomolekularen Systemen hat in den letzten Jahren aus mehreren Gründen erheblich zugenommen.<sup>[14,42,96,98,100,104]</sup> Unter anderem ist der größte Teil der Erdoberfläche mit Wasser bedeckt (~ 71 %) und davon liegen 86 % unterhalb einer Meerestiefe von 2000 Metern.<sup>[20]</sup> Diese Biosphäre stellt einen der größten, mikrobiellen Lebensräume dar, in denen ein großer Teil der Organismen unter hohen hydrostatischen Druckbedingungen (HHP) in der Tiefsee und auf dem Meeresboden lebt, wobei Drücke von 1 kbar (1 bar  $\triangleq$  10 m Tiefe) und mehr erreicht werden können.<sup>[45,46,97,191]</sup> Neben dem Verständnis des gegenwärtigen Lebens in der Tiefsee können HHP-Studien auch Einblicke in den potenziellen Geburtsort des Lebens auf der Erde geben, der sich unter solch harschen Bedingungen entwickelt haben könnte.<sup>[45-47]</sup>

Mit dem Ziel die Sekundärstruktur und Stabilität von ArgBP unter weiteren extremen Bedingungen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss von Hochdruck auf die domänenvertauschte Struktur des Proteindimers (im Folgenden als ArgBP<sup>20-246</sup> bezeichnet) untersucht. Um tiefere Einblicke in die Rolle zu erhalten, wie die verschiedenen Domänen des Proteins zur Sicherung der ArgBP-Stabilität beitragen, wurden die Untersuchungen auf die verkürzte, monomere Variante (ArgBP<sup>20-233</sup>) und auf die beiden gefalteten Fragmente des Proteins (ArgBP<sup>D1</sup> und ArgBP<sup>D2</sup>) ausgedehnt.

## 6.2 Probenpräparation

Alle untersuchten Varianten von ArgBP wurden unter Verwendung von zuvor berichteten Protokollen<sup>[233-236,239]</sup> rekombinant exprimiert. Obwohl den Proben kein exogenes Arginin zugesetzt wurde, deuten frühere Studien darauf hin, dass sowohl das Wild-Typ Dimer als auch das verkürzte Monomer ArgBP<sup>20-233</sup> den Liganden in der Bindungstasche enthalten.<sup>[232,235]</sup> Für die FTIR-Experimente wurden die jeweiligen lyophilisierten Pulver der verschiedenen Varianten

des Proteins in D<sub>2</sub>O unter Verwendung einer Amicon Ultra-Zentrifugationseinheit mit einem *Cutoff* von 10 kDa dialysiert und anschließend lyophilisiert. Eine Proteinkonzentration von 50 mg mL<sup>-1</sup>, sowie 50 mM Tris-Puffer wurden für die Messungen verwendet. Der pD-Wert wurde durch Zugabe von DCl oder NaOD auf 7.5 eingestellt.

### 6.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Auswirkung des Drucks auf das ArgBP-System wurde zunächst an der Wildtyp-Form des Proteins ArgBP<sup>20-246</sup> untersucht, das eine domänenvertauschte dimere Struktur aufweist. Um druckinduzierte Änderungen der Sekundärstrukturelemente aufzudecken, wurde mittels FTIR-Spektroskopie die Amid-I'-Bande bei einem Druckbereich von 1 bar bis 10 kbar bei 25 °C überwacht (Abbildung 6-2A). Die Amid-I'-Bandenregion von ArgBP<sup>20-246</sup> ist durch einen breiten Peak gekennzeichnet, der bei etwa 1640 cm<sup>-1</sup> zentriert ist und sich bei Druckerhöhung zu niedrigeren Wellenzahlen hin verschiebt. Die druckinduzierte Verschiebung scheint weitgehend linear zu sein, was typischerweise als eine rein elastische Verschiebung aufgrund der druckinduzierten Kompression chemischer Bindungen einzuordnen ist, die mit Änderungen der Kraftkonstante einhergehen.<sup>[241,242]</sup> Die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente des Proteins bei verschiedenen Drücken wurde aus der *curve fitting*-Analyse der zugrundeliegenden Subbanden abgeleitet, die durch die FSD und Analyse der zweiten Ableitung erhalten wurden (Abbildung i-5A,B). Bei 1 bar beträgt der prozentuale Anteil der Reste, die reguläre Sekundärstrukturmotive annehmen, ~ 35 %  $\alpha$ -Helices beziehungsweise ~ 29 %  $\beta$ -Faltblätter (Abbildung 6-2B). Diese Werte stimmen sehr gut mit denen überein, die sich aus der 3D-Kristallstruktur des Dimers ableiten lassen (Tabelle i-8).<sup>[233]</sup> Bemerkenswert ist, dass bei einem Druckerhöhung bis zu 10 kbar nur eine geringfügige Abnahme des  $\alpha$ -Helices-Anteils zu beobachten ist, die mit einer gleichzeitigen, leichten Zunahme der  $\beta$ -Faltblätter gekoppelt ist. Minimale, prozentuale Unterschiede wurden auch für die anderen Strukturmotive des ArgBP<sup>20-246</sup> beobachtet. Bei der Bestimmung sekundärer Strukturänderungen nach dieser Methode liegen diese Änderungen jedoch innerhalb der Fehlerbalken (1-3 %). Zu beachten ist außerdem, dass kleine Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Röntgendiffraktometrie und FTIR-Spektroskopie bei der Bestimmung der Sekundärstrukturanteile aufgrund unterschiedlicher Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zustande kommen, was in diesem Fall nicht entscheidend ist, da hier im Wesentlichen nur die relativen Änderungen diskutiert werden. Es gibt

keine Hinweise auf einen kooperativen Übergang, der auf eine globale Entfaltung/Denaturierung der Struktur bis zu 10 kbar hinweisen würde. Mittels Gl. 2-11 konnte aus der Druckabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten des Konformationsüberganges von  $\alpha$ -Helix zu  $\beta$ -Faltblatt eine Volumenänderung von nur  $-8 \pm 1 \text{ mL mol}^{-1}$  ermittelt werden (mit einem  $p_u$ -Wert von etwa 2.5 kbar), was etwa einem Zehntel der bei druckinduzierter Entfaltung von Monomeren typischerweise auftretenden Volumenänderung entspricht.<sup>[45,100]</sup> Die Veränderungen, die bei 10 kbar stattfinden, sind nach der Dekompression fast vollständig reversibel (schwarze Linie in Abbildung 6-2A und offene Symbole in Abbildung 6-2B, siehe auch Tabelle i-7). Diese geringfügigen Unterschiede sind wahrscheinlich auf das partielle Eindringen von Wassermolekülen bei hohen Drücken zurückzuführen, die bei Druckentlastung einen geringen Konformationsdrift mit langer Relaxationszeit verursachen könnte.

Ein ähnliches Bild ergibt sich aus der Analyse der verkürzten monomeren Variante ArgBP<sup>20-233</sup> (Abbildungen 6-2C,D und i-5C,D). Wie erwartet, reduziert die Deletion der C-terminalen Helix erwartungsgemäß den  $\alpha$ -Helices-Anteil bei 1 bar (Tabelle i-8). Bei Druckerhöhung ist der Trend der Sekundärstrukturänderung von ArgBP<sup>20-233</sup> im Vergleich zum Dimer trotz alledem nahezu identisch. Die beobachteten Konformationsänderungen werden zu kleineren Drücken ( $p_u \sim 1.5 \text{ kbar}$ ) verschoben und gehen mit einer Volumenänderung von  $-20 \pm 6 \text{ mL mol}^{-1}$  einher.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

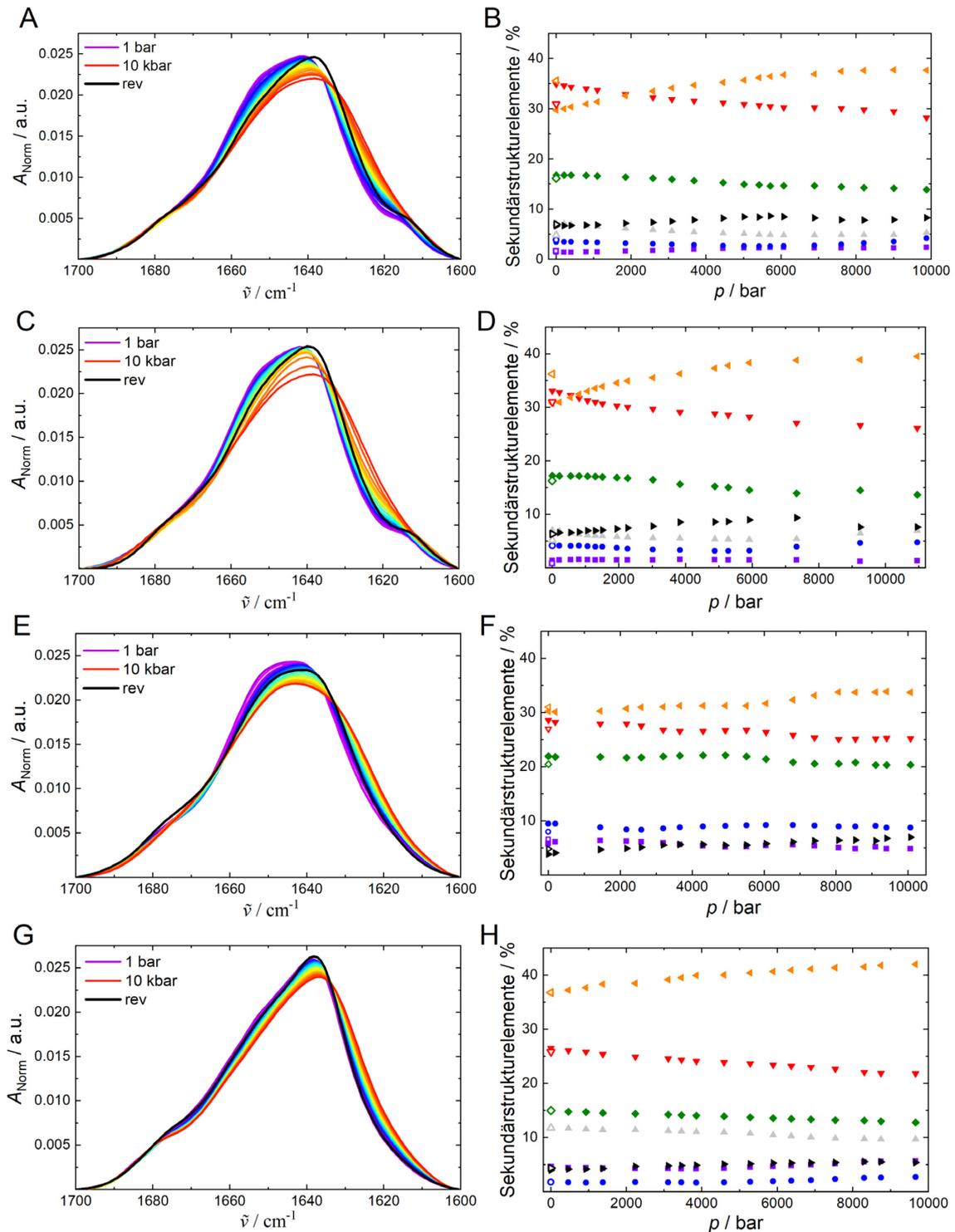


Abbildung 6-2: Druckinduzierte Änderungen der hintergrundkorrigierten und normierten Amid-I'-Bande aller untersuchten ArgBP-Varianten. ArgBP<sup>20-246</sup> (A), ArgBP<sup>20-233</sup> (C), ArgBP<sup>D1</sup> (E) und ArgBP<sup>D2</sup> (G) und die entsprechenden Änderungen der Sekundärstrukturelemente (B, D, F, H) (▼  $\alpha$ -Helices; ◀ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter; ◆ ungeordnete Strukturen; ▲, ● & ■  $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen; ► Seitenketten) bei 25 °C. Offene Symbole veranschaulichen den Prozentsatz der Sekundärstruktur nach der Dekompression (reversibel: schwarze Kurve in den Spektren).

Interessanterweise weisen auch die beiden gefalteten Domänen ArgBP<sup>D1</sup> und ArgBP<sup>D2</sup> eine bemerkenswerte Druckstabilität auf (Abbildung 6-2E,G). Die ermittelten Sekundärstrukturanteile dieser Formen unterscheiden sich nur geringfügig von denen im Kristallzustand beobachteten (Abbildung 6-2F,H und Tabelle i-7). Auch hier können Differenzen durch unterschiedliche Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Sekundärstrukturen auftreten, aber auch durch die begrenzte Genauigkeit von wenigen Prozent (2-3 %) bei der Analyse der FTIR-Daten in einer solchen Nanoliter-Proben-/Hochdruckumgebung der Diamantstempelzelle. Im Vergleich zu ArgBP<sup>20-246</sup> konnten kleine Änderungen der Sekundärstrukturanteile beobachtet werden, insbesondere bei den  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und ungeordneten Strukturen. Auch bei den Domänen nimmt der Anteil der  $\alpha$ -Helices auf Kosten der Bildung zusätzlicher  $\beta$ -Faltblätter geringfügig ab (etwa 0.3-0.5 % / kbar). Diese Änderungen sind nach der Dekompression vollständig reversibel (Tabelle i-8). Daher erweisen sich die gefalteten Strukturen von ArgBP<sup>D1</sup> und ArgBP<sup>D2</sup> selbst bis zu 10 kbar als sehr widerstandsfähig. Ferner implizieren diese Daten, dass die kleinen Änderungen des  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblattanteils bei Druckerhöhung mit kleinen Konformationsänderungen der inneren Domäne im vollständigen Komplex verbunden zu sein scheinen und nicht auf einen Konformationsdrift bei der Dissoziation zurückzuführen sind. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass ArgBP<sup>20-246</sup> trotz der eher lockeren Assoziation der beiden ausgetauschten Untereinheiten innerhalb des Dimers sehr druckstabil ist.

Um weitere mechanistische Erkenntnisse zu gewinnen, wurden die druckinduzierten Veränderungen der Intensitätsverhältnisse der Amid-II'- und Amid-I'-Banden zur Charakterisierung des H/D-Austausches der Amidprotonen des Peptidrückgrates ausgewertet (Abbildung 6-3). Während die mit der Amid I'-Bande verbundene Infrarotabsorption im Wesentlichen auf Streckschwingungen der C=O-Bindung zurückzuführen ist, beruht die mit der Amid-II'-Bande verbundene Absorption hauptsächlich auf Biegeschwingungen der N-H-Bindung, die sensitiv auf den H/D-Austausch reagiert, der auftritt, wenn die Proben in D<sub>2</sub>O (als Lösungsmittel) gelöst werden.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

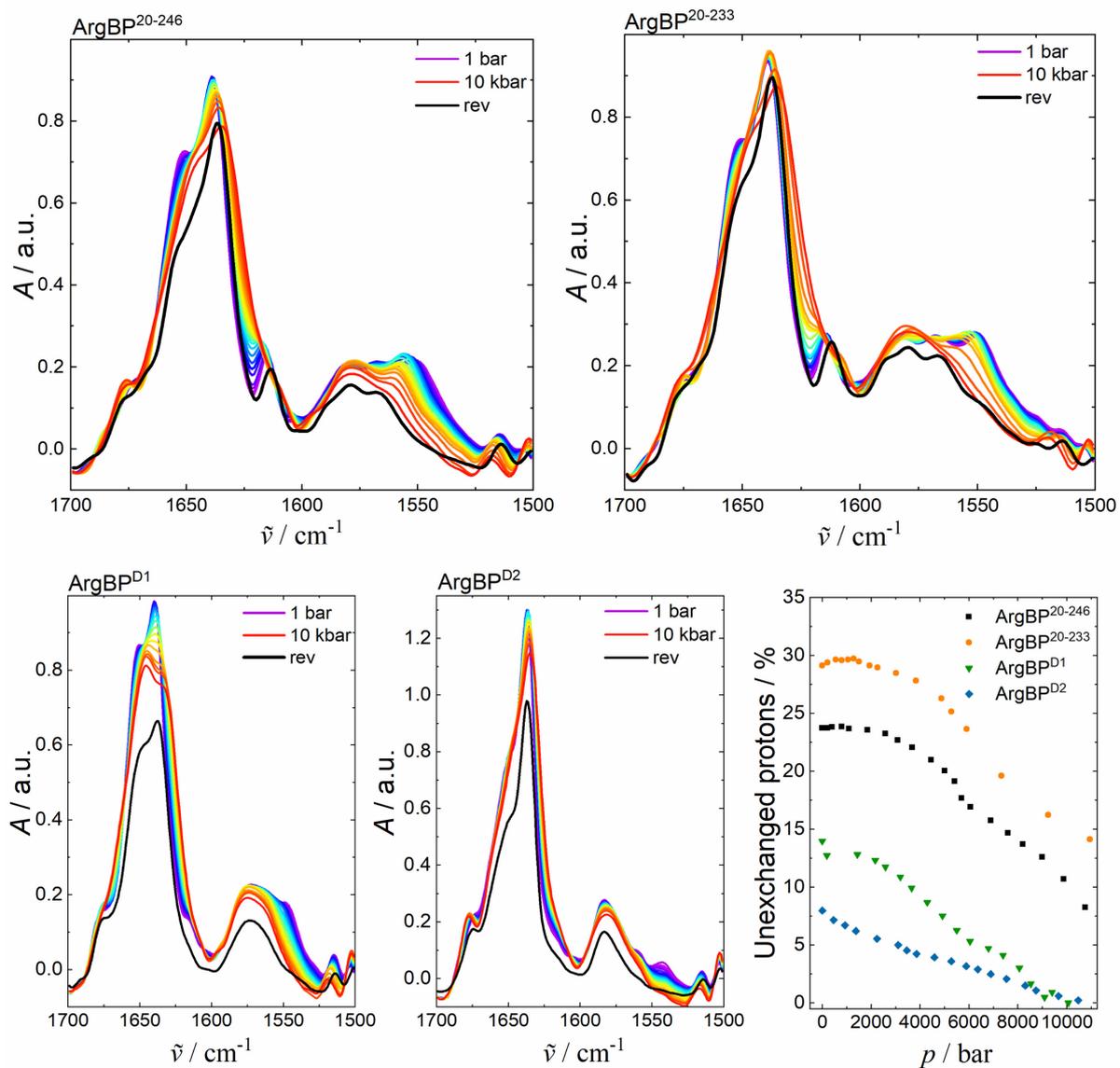


Abbildung 6-3: Druckabhängige Änderungen der FSD-Spektren für die verschiedenen Varianten von ArgBP in der Amid-I'-Banden- (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ) und Amid-II'-Bandenregion (1575-1480  $\text{cm}^{-1}$ ) bei 25 °C. (Ohne weitere Behandlung, um Informationen über den H/D-Austausch zu extrahieren, ohne die Intensitätsänderungen in der Amid II'-Bandenregion zu beeinträchtigen) H/D-Austausch von ArgBP aus *Thermotoga maritima* als Funktion des Drucks (unten rechts). Anteile nicht ausgetauschter Protonen wurden aus dem Verhältnis der Intensitäten bei  $\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$  und des Maximums der Amid-I'-Bande berechnet.<sup>[243]</sup>

Wie erwartet, weist das domänengetauschte Dimer ArgBP<sup>20-246</sup> und die monomere Variante ArgBP<sup>20-233</sup> bei Umgebungsdruck im Vergleich zu den beiden Domänen einen deutlich größeren Anteil an nicht ausgetauschten Protonen auf. Dies deutet darauf hin, dass ArgBP<sup>20-246</sup> und ArgBP<sup>20-233</sup> einen höheren Anteil an unzugänglichen Amidprotonen aufweist, welche in stabilen Wasserstoffbrückenbindungen eingeschlossen sind. Der H/D-Austausch der Amidprotonen

von ArgBP<sup>20-246</sup> erfolgt erst bei der Druckerhöhung oberhalb von etwa 2.5 kbar. Ab einem Druck von etwa 4 kbar wird ein kontinuierliches, druckinduziertes Eindringen einiger Wassermoleküle in das Innere des Proteins beobachtet. Ein ähnliches Szenario gilt für ArgBP<sup>20-233</sup>. Bezüglich der Sekundärstrukturanalyse (Abbildung 6-2) geht dieser Prozess nicht mit signifikanten Veränderungen der Sekundärstruktur oder mit der Entfaltung des Proteins bei hohen Drücken einher. Für diesen Effekt dürfte das druckinduzierte Eindringen von Wassermolekülen in das Proteininnere und der hierdurch ermöglichte Austausch der unzugänglichen Amidprotonen verantwortlich sein. Die Fragmentierung des Proteins in seine Domänen scheint mit einer Lockerung der inneren Struktur verbunden zu sein, wodurch der H/D-Austausch begünstigt wird. Bei etwa 10 kbar werden im Wesentlichen alle Amidprotonen in ArgBP<sup>D1</sup> und ArgBP<sup>D2</sup> ausgetauscht (Abbildung 6-3). Bemerkenswerterweise könnten Fluktuationen großer Amplitude, die die gesamte Polypeptidkette betreffen, ein spezifisches Merkmal von Proteinen aus Hyperthermophilen sein.<sup>[244]</sup>

Die vorliegende Studie zeigt, dass ArgBP<sup>20-246</sup> und seine gefalteten Fragmente zusätzlich zu der bereits früher berichteten außerordentlichen thermischen und chemischen Stabilität ihre Sekundärstruktur auch bei extremem Druck aufrechterhalten. Alle charakteristischen ArgBP-Varianten behalten selbst bei 10 kbar den größten Teil ihres Sekundärstrukturanteils bei. Die Fähigkeit des dimeren Wildtyp-Proteins, seine oligomere Struktur bei Druckerhöhung beizubehalten, ist eine außergewöhnliche Eigenschaft des Systems. Obwohl Hochdruck-SAXS- oder NMR-Daten erforderlich wären, um diese Beobachtung zu bestätigen, machen die sterischen Beschränkungen der scharnierartigen Peptidregion die Faltung der Austauschdomäne unwahrscheinlich<sup>[237]</sup> und verhindern die Dissoziation des ArgBP-Dimers. Die Fähigkeit des losen Dimers von ArgBP<sup>20-246</sup>, seine Struktur beizubehalten, ist daher auf die besonderen Wechselwirkungen zurückzuführen, die sich an der geschlossenen Grenzfläche bilden. Die geringfügige Konformationsänderung, die im Fall von ArgBP<sup>20-246</sup> im Druckbereich unter 6 kbar beobachtet wird, geht mit einer sehr geringen Volumenänderung von etwa -8 mL mol<sup>-1</sup> einher, was einem Volumen entspricht, das kleiner als das eines Wassermoleküls (18 mL mol<sup>-1</sup>) ist. Dies könnte auf eine druckinduzierte Abnahme des inneren Hohlraumvolumens und/oder auf Packungsdefekte zurückgeführt werden, die sich mit Wasser füllen.<sup>[117]</sup> Die Druckstabilität der Sekundärstruktur ist bei allen ArgBP-Varianten an eine signifikante Erhöhung des H/D-Austauschprozesses von Amidprotonen des Peptidrückgrates über ~4 kbar hinaus gekoppelt. Dies deutet auf ein druck-

induziertes Eindringen von Wassermolekülen in das Proteininnere aufgrund einer druckinduzierten Zunahme der Fluktuationen des Peptidrückgrats ohne großartige Sekundärstrukturveränderungen hin.

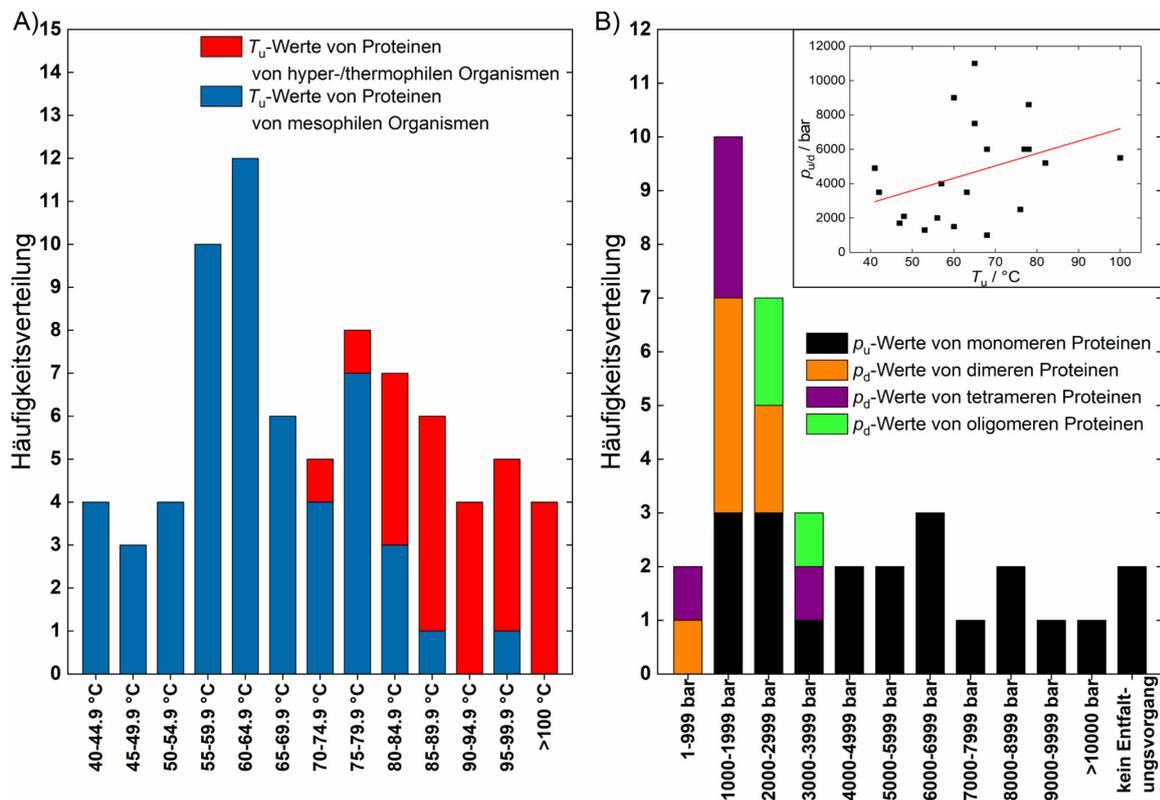


Abbildung 6-4: Häufigkeitsverteilung von A) Entfaltungstemperatur ( $T_u$ ) und B) -druck ( $p_u$ ) verschiedener aus der Literatur entnommener, untersuchter Proteine. Eine detaillierte Liste mit Referenzen ist in der Tabelle i-9 angegeben. Einschub B: Korrelation von  $T_u$ - und  $p_u$ -Werten von Proteinen, die in der Literatur charakterisiert wurden (Tabelle i-10). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsanalyse beträgt 0.34 und der  $p$ -Wert 0.13.

Um die vorliegenden Ergebnisse in einen breiteren Kontext zu stellen, wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt (Tabelle i-9), die die Entfaltungstemperatur ( $T_u$ ) und den Entfaltungsdruck ( $p_u$ ) einiger untersuchter Proteine widerspiegelt. Diese  $T_u$ - und  $p_u$ -Werte wurden durch eine Vielzahl verschiedener Techniken erhalten, einschließlich CD-, FTIR-, NMR-, Fluoreszenz-Spektroskopie, DSC, SAXS sowie Lichtstreuung.

Wie erwartet, zeigt die Häufigkeitsverteilung der  $T_u$ -Werte in Abbildung 6-4A, dass Proteine von mesophilen Organismen im Vergleich zu Proteinen, die aus thermophilen Organismen isoliert wurden, viel niedrigere Entfaltungstemperaturen aufweisen. Diese Ergebnisse stimmen mit

der Studie von PICOTTI *et al.* überein, die proteomweite, thermische Denaturierungsprofile von vier Organismen (*E. coli*, *T. thermophilus*, *S. cerevisiae* und von menschlichen Zellen) mithilfe der *limited proteolysis and mass spectroscopy* (LiP-MS) analysiert haben.<sup>[245]</sup> Um eine Aussage bezüglich der statischen Häufigkeitsverteilung des Entfaltungsdrucks zu treffen, wurden die Proteine in Abhängigkeit ihres oligomeren Zustands gruppiert (Abbildung 6-4B). Die Abbildung zeigt, bis auf wenige Ausnahmen, dass die Druckentfaltung von oligomeren Proteinen im Allgemeinen unterhalb von 4 kbar stattfindet, während die Druckentfaltung von monomeren Proteinen typischerweise oberhalb von 4 kbar beginnt. In diesem Szenario scheint das ArgBP-System eine bemerkenswerte Ausnahme zu sein, da es einen  $p_u$ -Wert von mehr als 10 kbar aufweist. Weiterhin wurde anhand der Literaturdaten (Tabelle i-10) überprüft, ob eine Korrelation zwischen den experimentell bestimmten  $T_u$ - und  $p_u$ -Werten einiger Proteine zu erkennen ist. Die Abbildung 6-4B (Einschub) zeigt eine eher geringe Korrelation zwischen den  $T_u$ - und  $p_u$ -Werten ( $p$ -Wert = 0.13), obwohl erwartet wird, dass Proteine von hyperthermophilen Organismen auch gegen Druckstress resistent sind.<sup>[117,246]</sup> Zusammengefasst zeigen die in Abbildung 6-4 grafisch aufgetragenen Daten, dass der oligomere Zustand eines Proteins einen größeren Einfluss auf die Druckstabilität hat als auf die Thermostabilität.

#### 6.4 Zusammenfassung

Das Arginin-bindende Protein (ArgBP) aus *Thermotoga maritima* besitzt mehrere besondere biophysikalische und strukturelle Eigenschaften. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ArgBP auch eine bemerkenswerte Druckstabilität aufweist, da es selbst bei 10 kbar nur geringfügig strukturellen Veränderungen unterliegt. Eine ähnliche Stabilität konnte auch für seine gefalteten Fragmente (das verkürzte Monomer sowie die einzelnen Domänen) beobachtet werden. Ein Überblick anhand von Literaturdaten zur Druckstabilität einer Vielzahl untersuchter Proteine bestätigt das ungewöhnlich stabile Verhalten von ArgBP.

## **7. Druckeinfluss auf die Enzymaktivität unter Perchlorat-Stress: Auswirkungen auf die Bewohnbarkeit des Mars**

### 7.1 Einleitung

Bei der Suche nach bewohnbaren Nischen an anderen Orten im Kosmos besteht ein Kriterium in dem Vorhandensein von flüssigem Wasser, welches nach derzeitigem Verständnis für die ablaufenden Lebensprozesse von entscheidender Bedeutung ist.<sup>[247]</sup> Daher wurde viel Aufmerksamkeit auf die Oberfläche des Mars gelegt, bei der Anzeichen von flüssigem Wasser beobachtet wurde oder dessen Existenz vorhergesagt wird.<sup>[64,248]</sup> Das bloße Vorhandensein von flüssigem Wasser allein macht eine Umgebung jedoch nicht lebensfreundlich. Die Art und Weise, wie das Leben auf externe, physikalische Faktoren, wie Temperatur, Druck, pH-Wert und Salzgehalt reagiert, bestimmt auch die Grenzen der Habitabilität.<sup>[60,249]</sup> Auf dem Mars sind tiefe, wässrige Umgebungen die besten Kandidaten für habitable Lebensräume. Diese befinden sich am Mars-Südpol in Gestalt eines subglazialen Sees<sup>[64]</sup> oder unter der Mars-Kryosphäre in Form des tiefen Grundwassers<sup>[248]</sup>. Das Grundwasser des Mars würde am Boden der Kryosphäre an den Marspolen einem Druck von 1 kbar ausgesetzt sein, wenn es eine Tiefe von 10 km erreicht.<sup>[248]</sup> Da auf der Marsoberfläche geringe Mengen an Perchloratsalzen detektiert wurden,<sup>[250]</sup> wurde angenommen, dass bei den oben beschriebenen kalten Umgebungen hohe Konzentrationen an Perchloratsalzen unter der Oberfläche für eine starke Gefrierpunktserniedrigung sorgen könnten. Jedoch wurde auch gezeigt, dass Perchloratsalze durch den oxidativen Stress nachteilige Auswirkungen auf mikrobielles Leben auf der Erde haben<sup>[65,251]</sup>, weshalb dieser Faktor die Lebensfähigkeit dieser Umgebungen mit beeinflussen kann. Zusätzlich zu den Perchloratsalzen sind Sulfate weit über die Marsoberfläche verteilt.<sup>[252]</sup>

Um die Habitabilität von unterirdischen Umgebungen beurteilen zu können, wurde in diesem Projekt der kombinierte Einfluss von mehrfach geladenen, ionischen Salzen und hohen Drücken untersucht. Obwohl über die Auswirkungen von zellulären, organischen Osmolyten auf Organismen, die in der Tiefsee unter Hochdruckbelastungen von bis zu 1 kbar vorkommen<sup>[22,45,46]</sup>, recht viel bekannt ist, ist die kombinierte Wirkung von hohem Salzgehalt, niedriger Temperatur und hohem Druck auf biochemische Prozesse immer noch *terra incognita*. Bisher sind als einzige Gruppe von Organismen, die in der Lage sind, enorme Mengen an anorganischen Salzen (insbesondere  $K^+$  bis zu 3-5 M) bei Umgebungsdruck zu tolerieren, die extrem halophilen Vertreter der Archaeen bekannt.<sup>[93]</sup>

Frühere Studien haben die denaturierenden Auswirkungen von chaotropen Ionen, wie Perchloraten, auf die Aktivität von  $\alpha$ -CT und anderen Enzymen gezeigt.<sup>[65,253]</sup> Umgekehrt haben stabilisierende Salze, wie Natriumsulfat,<sup>[254]</sup> nachweislich die Aktivität und strukturelle Stabilität von  $\alpha$ -CT erhöht.<sup>[255]</sup> Das Wissen darüber, wie diese Salze die Enzymaktivität beeinflussen, ist weitgehend auf Umgebungstemperaturen und -drücke beschränkt. Deshalb ist das Ziel dieser Studie ein besseres Verständnis bezüglich der Auswirkungen dieser Effekte unter hohem Druck zu erreichen.

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen von Mars-relevanten Salzen ( $\text{MgSO}_4$  und  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ) und hohen hydrostatischen Drücken auf die Aktivität und strukturelle Stabilität von  $\alpha$ -CT, einem Archetyp eines Verdauungsenzyms, untersucht. Die hier untersuchten Konzentrationen von  $\text{MgSO}_4$  und  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  erlauben einen Vergleich der Auswirkungen beider Salze auf dieses System, da Konzentrationen von  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  von mehr als 1 M die Entfaltung von  $\alpha$ -CT bei Raumtemperatur induzieren. Diese Arbeit fördert das Verständnis darüber, wie sich der kombinierte Einfluss von hohen Konzentrationen dieser Ionen und hohem Druck auf die Biochemie und auf die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen auswirkt.

## 7.2 Probenpräparation

Lyophilisiertes  $\alpha$ -CT aus dem Rinderpankreas, Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), sowie die Salze  $\text{MgSO}_4$  und  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  wurden von Sigma Aldrich erhalten. Für die Messung der Enzymaktivität wurden die erworbenen Chemikalien ohne weitere Aufreinigung verwendet. Unter Verwendung der Hochdruck-Stopped-Flow-Apparatur wurden die Messungen der Enzymaktivität in Zusammenarbeit mit STEWART GAULT durchgeführt. Das Enzym wurde als 20  $\mu\text{M}$  gepufferte Stammlösung (0.1 M Tris-HCl, 0.01 M  $\text{CaCl}_2$ , pH = 7.8) in Ab- oder Anwesenheit von  $\text{MgSO}_4$  oder  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  bei entweder 0.25 M oder 0.5 M gelöst. Stammlösungen von *N*-Succinyl-Phe-*p*-Nitroanilid (SPpNA) wurden bei einer Konzentration von 8 mM in den gleichen Puffer- und Salzkonzentrationen wie bei der Enzymstammlösung hergestellt. Für die Messung der Enzymaktivität wurden folgende Substratkonzentrationen gewählt: 0.25, 0.5, 1, 2 und 4 mM, wobei nach dem Mischen die jeweilige Konzentration an Enzym oder Substrat im Aktivitätsassay halbiert wurde. Die getesteten Drücke betragen 1, 500, 1000, 1500 und 2000 bar. Die Reaktion wurde 50 Sekunden nach dem Mischen als Änderung der Extinktion aufgrund der Bildung des Reaktionsproduktes *p*-Nitroanilin verfolgt (siehe Abbildung 3-2). Die

Temperatur wurde durch einen externen Thermostaten geregelt und auf 20 °C gehalten. Die kinetischen Parameter wurden analog zu den anderen Projekten mithilfe von Gl. 2-2 und 2-6 ausgewertet.

Zur Durchführung der FTIR-Experimente wurde das Enzym  $\alpha$ -CT unter Verwendung einer Amicon Ultra-Zentrifugationseinheit mit einer Porengröße von 10 kDa gegen D<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend lyophilisiert. Für die druckabhängigen FTIR-Studien wurden die Messungen in 100 mM Tris-Puffer mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> in Ab- und Anwesenheit von Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> und die temperaturabhängigen Experimente in einem 100 mM Phosphatpuffer mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> durchgeführt. Der pH-Wert beider Puffer wurde durch Zugabe von HCl auf 7.8 eingestellt. Im Kapitel 2.2.2 Experimentelles ist die jeweilige Messzelle, sowie Durchführung und Auswertung des Versuchs im Detail aufgeführt. Die thermische Äquilibrierungszeit betrug 15 Minuten, für die druckabhängigen Studien betrug die Äquilibrierungszeit fünf Minuten. Es wurde eine Proteinkonzentration von 5 gew.-% gewählt und die Temperatur der jeweiligen Messzelle wurde mit einem externen, zirkulierenden Wasserthermostat reguliert. Entfaltungstemperaturen sowie Entfaltungsdrücke konnten mithilfe Gl. 2-10 und Gl. 2-11 berechnet werden.

### 7.3 Ergebnisse und Diskussion

Die kombinierte Wirkung von Druck und hohen Konzentrationen von Mars-relevanten Salzen auf Enzymreaktionen wurde bisher noch nicht untersucht. Die MICHAELIS-MENTEN-Diagramme in Abbildung 7-1 zeigen die Aktivität von  $\alpha$ -CT in Abwesenheit und Gegenwart von MgSO<sub>4</sub> und Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Aktivität von  $\alpha$ -CT mit zunehmendem Druck steigt, was auch bereits in früheren Studien beobachtet wurde.<sup>[98,130,256]</sup> Die Abbildungen 7-2a,b veranschaulichen, dass die MICHAELIS-Konstante mit zunehmenden Druck leicht verringert wird, womit die Affinität des Substrats bei Kompression leicht zunimmt. Die Wechselzahl erhöht sich um das 2-3fache (Abbildung 7-2c,d) und die katalytische Effizienz steigt um den Faktor 5 bei einer Kompression von 1 bis 2000 bar (Abbildung 7-2e,f). In Tabelle i-11 sind die kinetischen Parameter von  $\alpha$ -CT im Tris-Puffer in Abwesenheit und Gegenwart von MgSO<sub>4</sub> und Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> aufgeführt. Die Daten zeigen, dass die Wechselzahl von  $\alpha$ -CT bei jedem gemessenen Druckpunkt bei beiden Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Konzentrationen niedriger ist als im reinen Puffer. Trotz der niedrigeren  $k_{cat}$ -Werte führen die verringerten  $K_M$ -Werte zu einer höheren katalytischen Effizienz bei 2000 bar und 0.25 M Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> im Vergleich zu rei-

nem Puffer, während die katalytische Effizienz bei 2000 bar in Anwesenheit von 0.5 M  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  reduziert ist. Das Enzym  $\alpha$ -CT weist bei Kompression in Gegenwart von  $\text{MgSO}_4$  bei beiden untersuchten Konzentrationen höhere  $k_{\text{cat}}$ -Werte, niedrigere  $K_M$ -Werte und größere katalytische Effizienzen auf.

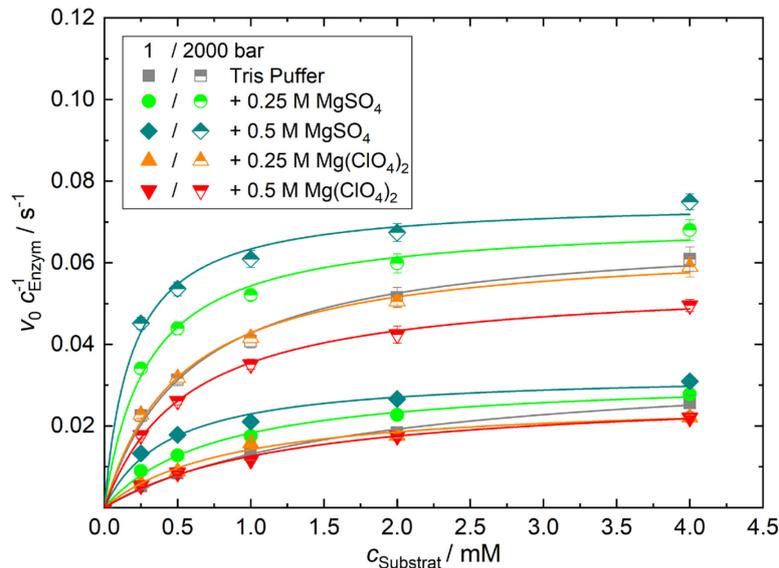


Abbildung 7-1: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme der enzymatischen Aktivität von  $\alpha$ -CT bei 20 °C in verschiedenen Pufferlösungen bei den zwei ausgewählten Drücken von 1 bar und 2 kbar.

Die Änderung der kinetischen Parameter, sowohl in realen Zahlen als auch in Prozent, sind in den Abbildungen 7-2a-f aufgeführt. Die größte proportionale Änderung von  $k_{\text{cat}}$  von 1 auf 2000 bar wurde in Gegenwart von 0.25 M  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  (+144 %) beobachtet. Für die MICHAELIS-Konstante konnte die größte proportionale Änderung im reinem Puffer (-77 %) und von  $k_{\text{eff}}$  in Gegenwart von 0.25 M  $\text{MgSO}_4$  (+466 %) beobachtet werden.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

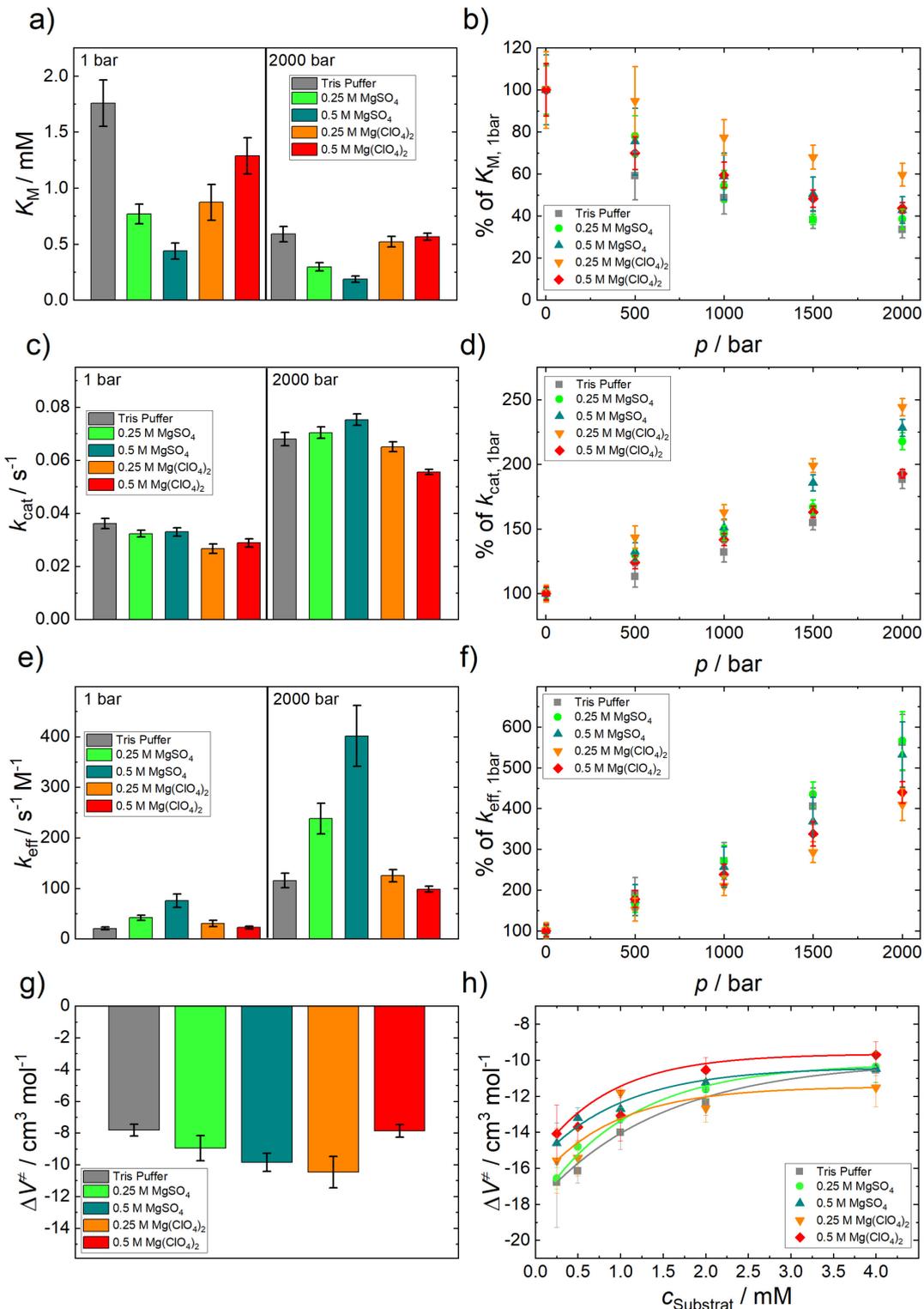


Abbildung 7-2: a, c, e) Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ , und  $k_{eff}$ ) der  $\alpha$ -CT-katalysierten Hydrolysereaktion von SppNA unter verschiedenen Salzbedingungen. B, d, f) Jede untersuchte Salzbedingung wurde bei 1 bar auf ihre eigenen, kinetischen Parameter normiert (Startpunkt: 100 %). Aktivierungsvolumen g) bei hohen Substratkonzentrationen (dementsprechend die für  $k_{cat}$  verantwortliche Volumenänderung) und h) in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Abbildung 7-2g und Tabelle i-12 zeigen die Daten für das Aktivierungsvolumen, die mittels Gl. 2-6 bestimmt wurden. Alle berechneten Aktivierungsvolumina weisen einen negativen Wert (Größenordnung  $-8$  bis  $-11 \text{ mL mol}^{-1}$ ) auf, der dem in der Literatur beschriebenen Wert ähnlich ist.<sup>[109,168]</sup> Darüber hinaus steigt  $\Delta V^\ddagger$  mit zunehmender Substratkonzentration leicht an (Abbildung 7-2h und Tabelle i-13) und erreicht Plateauwerte für Substratkonzentrationen von etwa  $2 \text{ mM}$ , d. h. für Konzentrationen, bei denen das Enzym mit Substrat gesättigt vorliegt. Da bei hohen Substratkonzentrationen,  $v_0 \propto k_{\text{cat}}$  gilt, beschreibt das Aktivierungsvolumen die Volumendifferenz von Übergangszustands ( $\text{ES}^\ddagger$ ) und Enzym-Substrat-Komplexes ( $\text{ES}$ ), während bei niedrigeren Substratkonzentrationen  $v_0 \propto k_{\text{cat}}/K_M$  gilt und somit die Volumenänderung der Substratbindung mit eingeschlossen wird.<sup>[79,81]</sup> Der Beitrag der Substratbindung scheint geringfügig von den jeweiligen Lösungsbedingungen abzuhängen und beträgt etwa  $-4$  bis  $-6 \text{ mL mol}^{-1}$ . Das bedeutet im Umkehrschluss, dass der ES-Komplex im Vergleich zu den Teilvolumina von Enzym und Substrat etwas kompakter ist, da vermutlich Hohlräume der aktiven Tasche durch die Substratbindung verringert werden.  $\Delta V^\ddagger$ -Werte für alle untersuchten Salzbedingungen zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum reinen Puffer. Insgesamt ist der Übergangszustand kompakter als der ES-Komplex, was auf eine Abnahme des Hohlraumvolumens und/oder eine Hydratation von Ladungen (Elektrostriktionseffekt) im Übergangszustand zurückgeführt werden könnte.

Der Unterschied in der Wirkung beider Salze ist weitgehend darauf zurückzuführen, inwieweit sie bevorzugt mit dem Peptid wechselwirken (Perchlorat) oder von der Peptidoberfläche ausgeschlossen sind (Sulfat).<sup>[257]</sup> Erwähnenswert ist auch, dass dies zwar als Anionen- oder Kationeneffekt betrachtet werden kann, aber aufgrund des unterschiedlichen Ausmaßes, in dem sich die Ionen in Wasser miteinander paaren, das gesamte Salz betrachtet werden sollte.<sup>[258]</sup>

7.3 Ergebnisse und Diskussion

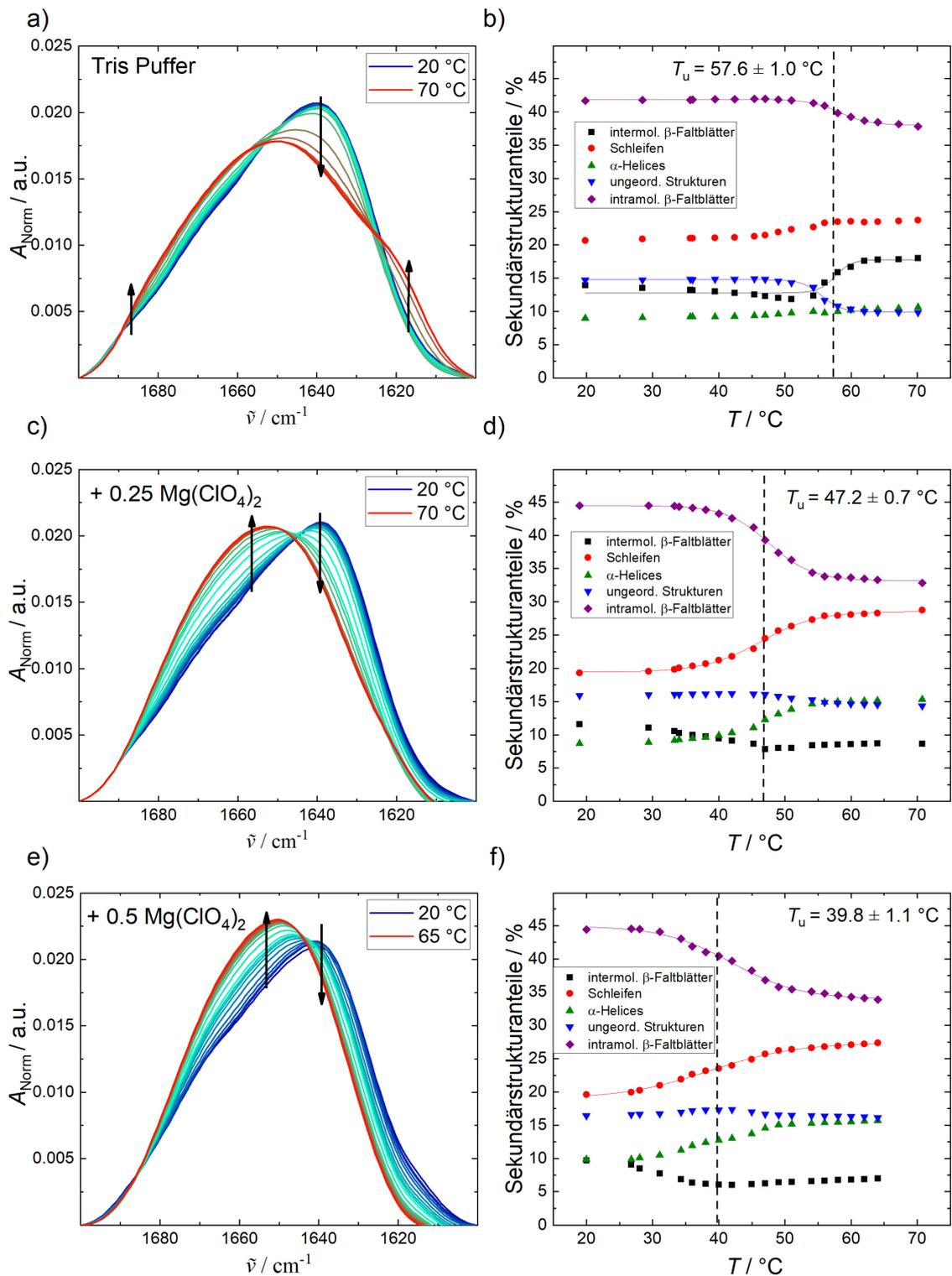


Abbildung 7-3: Normierte, temperaturabhängige FTIR-Spektren von  $\alpha$ -CT ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ). a) in reinem Puffer (+  $10 \text{ mM CaCl}_2$ ), c)  $0.25 \text{ M}$  und e)  $0.5 \text{ M Mg(ClO}_4)_2$  bei Umgebungsdruck und die entsprechenden Sekundärstrukturänderungen (b, d, f), die sich aus dem Kurvenanpassungsverfahren ergeben. Pfeile symbolisieren den steigenden Verlauf der Temperatur und die Linien repräsentieren die BOLTZMANN-Anpassungen an die experimentellen Daten unter Verwendung von Gl. 2-10.

Um den temperatur- und druckabhängigen Entfaltungsprozess von  $\alpha$ -CT im Detail verfolgen zu können, wurden die Sekundärstrukturänderungen in Gegenwart von Magnesiumperchlorat im Vergleich zu reinem Puffer (+10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) mittels FTIR-Spektroskopie gemessen, wobei ein Temperaturbereich zwischen 20 bis 70 °C und ein Druckbereich zwischen 1 bar bis 10 kbar (1 GPa) gewählt wurde. Abbildung 7-3 zeigt die normierten, temperaturabhängigen FTIR-Spektren von  $\alpha$ -CT (Abbildung 7-3a,c,e) sowie die entsprechenden Änderungen der Sekundärstrukturelemente (Abbildung 7-3b,d,f) für verschiedene Konzentrationen an Perchlorat. Bei Atmosphärendruck und 20 °C zeigt die Amid-I'-Bande von  $\alpha$ -CT im reinen Puffer eine breite Bande bei  $1638\text{ cm}^{-1}$ , während bei hohen Temperaturen Aggregationsbanden bei  $1617\text{ cm}^{-1}$  und  $1684\text{ cm}^{-1}$  auftreten. Die erhaltenen Sekundärstrukturkomponenten (Abbildung 7-3b), die aus dem Kurvenanpassungsverfahren ermittelt wurden, stimmen mit früheren Ergebnissen von MEERSMAN *et al.* überein.<sup>[259]</sup>

Bei Atmosphärendruck und 20 °C weist das Enzym einen hohen Anteil an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 43\%$ ) und Schleifen ( $\sim 21\%$ ) sowie geringe prozentuale Anteile an  $\alpha$ -Helices ( $\sim 9\%$ ) auf. Diese Ergebnisse stimmen ziemlich gut mit den kristallographischen Daten überein.<sup>[260]</sup> Die beobachteten, geringfügigen Unterschiede zwischen den Röntgenbeugungs- und FTIR-Ergebnissen (siehe auch Tabelle i-14) können auf unterschiedliche Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zurückgeführt werden, was nicht ausschlaggebend ist, da hier im Wesentlichen nur auf relative Änderungen eingegangen wird. Bei der temperaturinduzierter Entfaltung nimmt der intramolekulare  $\beta$ -Faltblatt-Anteil um etwa 5 % ab und die Aggregation des Proteins in reinem Puffer erfolgt durch Bildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblätter (Abbildung 7-3b).

Bemerkenswerterweise tritt in Gegenwart von  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  während des temperaturinduzierten Entfaltungsprozesses keine Aggregation durch Bildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblätter auf. Statt der Zunahme intermolekularer  $\beta$ -Faltblätter wird hier ein Anstieg an Schleifen und  $\alpha$ -Helices beobachtet, wobei die relative Abnahme der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter auch in Anwesenheit von Perchlorat festgestellt werden konnte. Mit zunehmender Perchloratkonzentration sinkt die Entfaltungstemperatur von  $\alpha$ -CT von 57.6 °C auf 39.8 °C. Das Salz führt zu einer deutlichen Abnahme der Temperaturstabilität des Proteins. Ferner nimmt die Breite des sich entfalteten Übergangsbereich bei Zugabe von Perchlorat zu, was auf eine abnehmende Kooperativität des Übergangs hindeutet.

Abbildung 7-4 zeigt die normierten, druckabhängigen FTIR-Spektren von  $\alpha$ -CT (Abbildung 7-4a,c,e) und die entsprechenden Sekundärstrukturänderungen (Abbildung 7-4b,d,f) bei verschiedenen Perchloratkonzentration für 35 °C im Bereich von 1 bis  $10^4$  bar. Mit zunehmendem Druck in reiner Pufferlösung verschiebt sich die Amid-I'-Bande zu höheren Wellenzahlen und eine partielle Entfaltung wird bei etwa 6.7 kbar beobachtet. Hinsichtlich der relativen Änderungen der Sekundärstrukturelemente nimmt der prozentuale Anteil an Schleifen und  $\alpha$ -Helices ( $\sim +4$  %) zu, während der Prozentsatz der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter bei der Kompression gleichzeitig abnimmt ( $\sim -4$  %). In Gegenwart von 0.25 M  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  sind die relativen Sekundärstrukturänderungen ähnlich und  $\alpha$ -CT entfaltet teilweise bei einem niedrigeren Druck (5.6 kbar, 35 °C) im Vergleich zum reinen Puffer. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Enzym auch in Gegenwart von  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  sehr druckstabil und die temperatur- und druckinduzierte (partielle) Entfaltung unter allen gemessenen Bedingungen irreversibel ist.

Im Gegensatz zum konformationellen Entropiegewinn der Peptidkette, die im Wesentlichen die Triebkraft für die temperaturinduzierte Entfaltung von Proteinen darstellt, spielen für den druckinduzierten Entfaltungsprozess Volumenänderungen und Kompressibilitäten eine entscheidende Rolle, wobei das System ein kleineres Volumen bei höheren Drücken anstrebt.<sup>[97,210]</sup>

Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, wurde die Volumenänderung der teilweisen Entfaltung,  $\Delta V_u$ , mittels Gleichung 2-11 bestimmt. Für die teilweise Entfaltung von  $\alpha$ -CT bei 35 °C in Abwesenheit von  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  konnte ein Wert von  $\Delta V_u = -41 \pm 7 \text{ mL mol}^{-1}$  ermittelt werden, der mit der Volumenänderung des *precursors* (Chymotrypsinogen) konsistent ist<sup>[261]</sup>, und einen typischen Wert für die Entfaltung monomerer Proteine darstellt.<sup>[94,107,174,210]</sup> Bei niedrigeren Temperaturen (z. B. 25 °C) oder höheren Perchloratkonzentrationen (0.5 M) werden bei druckinduzierter Entfaltung geringere Veränderungen der Sekundärstrukturelemente beobachtet, was sich in kleineren  $\Delta V_u$ -Werten widerspiegelt.

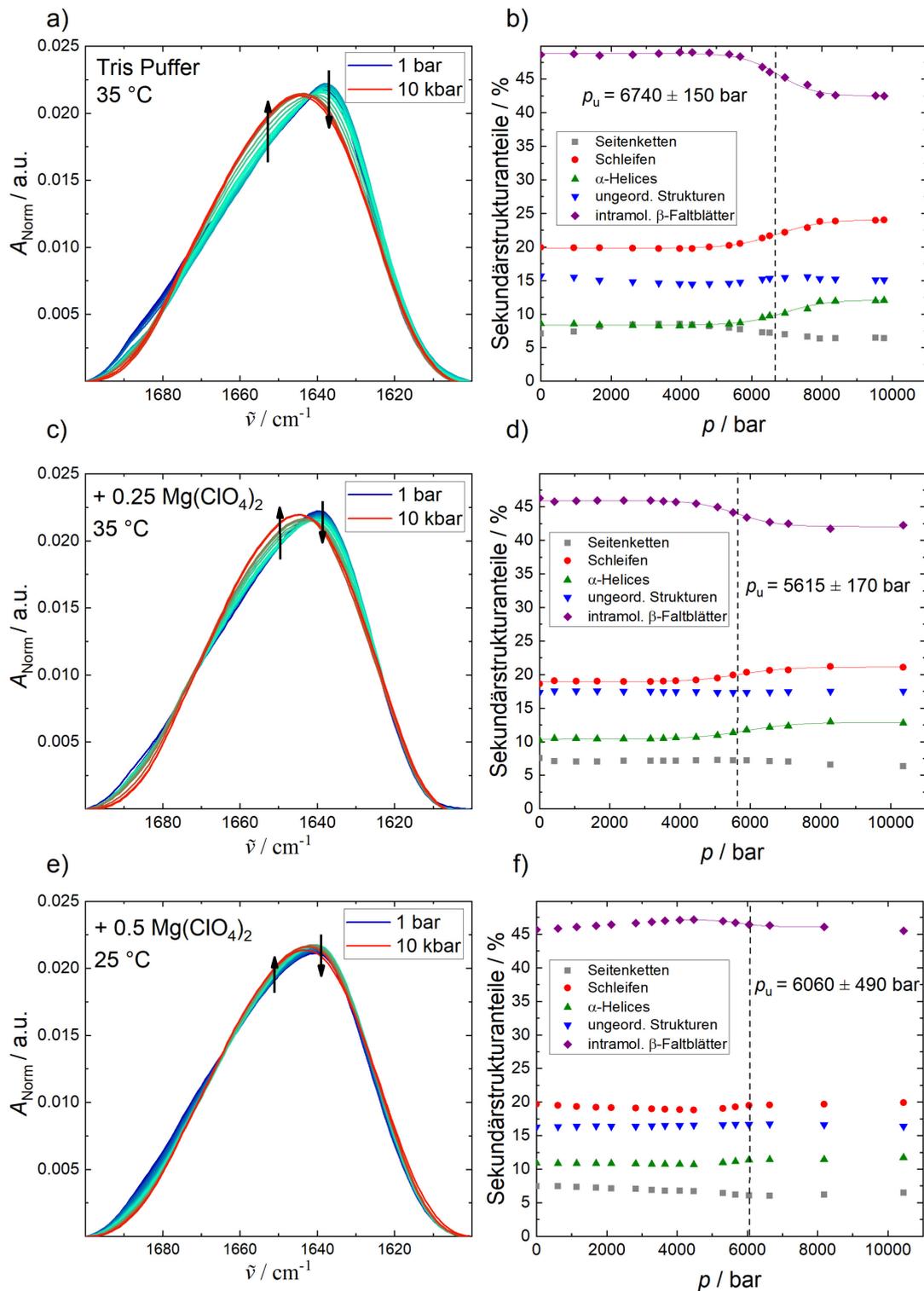


Abbildung 7-4: Normierte, druckabhängige FTIR-Spektren von  $\alpha$ -CT ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ). a) in reinem Puffer (+  $10 \text{ mM CaCl}_2$ ), c)  $0.25 \text{ M}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  und e)  $0.5 \text{ M Mg(ClO}_4)_2$  bei  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  und die entsprechenden Sekundärstrukturänderungen (b, d, f), die sich aus dem Kurvenanpassungsverfahren ergeben. Pfeile symbolisieren den steigenden Verlauf der Temperatur und die Linien repräsentieren die BOLTZMANN-Anpassungen an die experimentellen Daten unter Verwendung von Gl. 2-11.

Anhand dieser temperatur- und druckabhängigen FTIR-Messungen konnte ein  $p$ ,  $T$ -Stabilitätsphasendiagramm von  $\alpha$ -CT in An- und Abwesenheit von Magnesiumperchlorat erstellt werden, welches in Abbildung 7-5 dargestellt ist. Bei niedrigeren Temperaturen und Drücken wird der native Zustand des Proteins bevorzugt. Beim Überschreiten der Phasengrenze zum entfalteten Zustand verliert die native Konformation ihre Stabilität und das Protein entfaltet sich teilweise, wodurch seine enzymatische Aktivität verloren geht. Wie aus Abbildung 7-5 deutlich zu erkennen ist, verringert eine Erhöhung der Perchloratkonzentration die Druck- und die Temperaturstabilität des Proteins, wodurch die Grenze zu niedrigeren Temperatur- und Druckwerten verschoben wird. Das Enzym ist jedoch im gesamten  $p$ ,  $T$ -Bereich, der in den HPSF-Studien abgedeckt wurde, und auch in Gegenwart beider verwendeten Salzkonzentrationen stabil.

Literaturdaten zum Phasendiagramm des  $\alpha$ -CT gibt es nur für andere Lösungsbedingungen. Zum Beispiel findet die Entfaltung des Proteins in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  bei 4.9 kbar ( $T = 21\text{ °C}$ ) und bei  $41\text{ °C}$  (Umgebungsdruck) statt.<sup>[262]</sup> Wie erwartet, wirken sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen positiv auf die Temperatur- und Druckstabilität des Proteins aus, höchstwahrscheinlich durch die Verringerung der Repulsion negativ geladener Seitenketten des Proteins. Eine stabilisierende Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf das Protein wurde auch in anderen Entfaltungsstudien beobachtet.<sup>[263,264]</sup> Eine ausgeprägte, destabilisierende Wirkung von Perchlorat, das ein typisches Anion mit niedriger Ladungsdichte am äußersten Rand der HOFMEISTER-Reihe für Anionen ist, wurde auch bei Lysozym ( $\text{pH} = 7$ ) beobachtet und ist voraussichtlich auf eine schwache Bindung der Perchlorat-Anionen an das Protein zurückzuführen.<sup>[265,266]</sup> Dies reduziert die GIBBS-Energie, die mit der Hydratisierung des exponierten Inneren des Proteins bei der Entfaltung verbunden ist, wodurch das native Protein destabilisiert wird. Wie von DOUGAN *et al.* (2017)<sup>[267]</sup> gezeigt wurde, ändert sich auch die Wasserstruktur bei hohen Perchloratkonzentrationen, die den Bedingungen im Marsboden nachempfunden sind, deutlich. Die Arbeitsgruppe hatte außerdem herausgefunden, dass die tetraedrische Struktur von Wasser stark beeinträchtigt wird, wobei die Auswirkungen vergleichbar sind mit dem Effekt von hohem Druck (in einer Größenordnung von etwa 20 kbar) auf reines Wasser. Interessanterweise liegen die  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{ClO}_4^-$ -Ionen unter diesen Bedingungen, über mehrere wasserstoffbrückenbildende Wassermoleküle hinweg, ladungsgeordnet vor, wodurch die Eisbildung bei niedrigen Temperaturen verhindert wird.

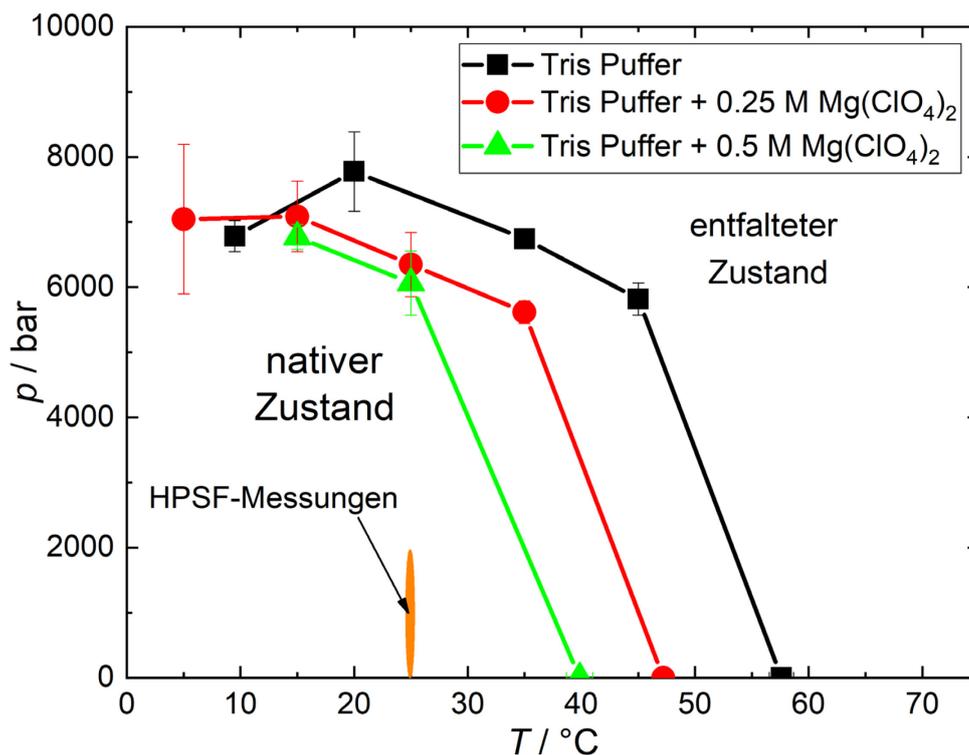


Abbildung 7-5:  $p$ ,  $T$ -Stabilitätsphasendiagramm von  $\alpha$ -CT ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ , +  $10 \text{ mM CaCl}_2$ ) in Abhängigkeit verschiedener  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ -Konzentrationen. Die Linien, mit  $\Delta G = 0$ , stellen den Übergang vom nativen in den (teilweise) entfalteten Zustand dar. Die kinetischen Untersuchungen an der HPSF-Apparatur wurden in einem Bereich durchgeführt, bei dem das Protein im nativ gefalteten Zustand vorliegt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

## 7.4 Zusammenfassung

Über die Auswirkungen hoher Ionenkonzentrationen auf die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen oder die kombinierte Wirkung von Ionen und hohem Druck ist wenig bekannt. Dennoch können diese Kombinationen die Habitabilität tiefer, unterirdischer Umgebungen auf der Erde und möglicherweise auch auf anderen Planeten potenziell beeinflussen. Obwohl die Frage, ob auf dem Mars Leben möglich ist, weiterhin spekulativ bleibt, können Überlegungen angestellt werden, wie die auf dem Mars zu erwartenden physikalischen und chemischen Bedingungen theoretisch die Lebensfähigkeit beeinflussen. Terrestrische Organismen und Biomoleküle können verwendet werden, um den Grenzraum der Überlebensfähigkeit unter den genannten Marsbedingungen zu erforschen. In dieser Studie wurde ein gut charakterisiertes Enzym verwendet, um die kombinierten Effekte von Perchlorat-Ionen und hohen Drücken unter diesen Extrembedingungen zu untersuchen. Aus den MICHAELIS-MENTEN-Diagrammen ist ersichtlich, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks auch die Enzymaktivität von  $\alpha$ -CT

erhöht, selbst in Gegenwart hoher Konzentrationen des chaotropen Salzes  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ . Da  $\alpha$ -CT ein negatives Aktivierungsvolumen aufweist, wird die mit dem Druck zunehmende Aktivität weitgehend auf das zuvor beschriebene Prinzip von LE CHÂTELIER zurückgeführt.<sup>[98,130,256]</sup> Anhand der Kinetikparameter konnte gezeigt werden, dass  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  die Aktivität von  $\alpha$ -CT bei beiden Konzentrationen, 0.25 M und 0.5 M, und unter allen getesteten Druckbedingungen reduziert. Dies steht mit früheren Studien bei Umgebungsdruck im Einklang, die die gleiche Wirkung von Perchloratsalzen auf  $\alpha$ -CT und andere Enzyme zeigten.<sup>[65,253]</sup> Darüber hinaus stimmt die Beobachtung, dass  $\text{MgSO}_4$  die Aktivität von  $\alpha$ -CT erhöht, mit früheren Studien überein, die zeigen, dass das Sulfat-Ion Proteine stabilisiert<sup>[254]</sup> und die Aktivität von  $\alpha$ -CT erhöhen kann<sup>[255]</sup>. Dieser sulfatinduzierte Effekt ist auch vom Substrat abhängig, da er in einer kinetischen Studie unter Verwendung des Substrats *N*-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethylester nicht festgestellt wurde.<sup>[255]</sup>

Infolge eines steigenden hydrostatischen Drucks wurden für die verschiedenen Salzbedingungen unterschiedliche proportionale Erhöhungen der  $k_{\text{cat}}$ -Werte beobachtet. Aus früheren Studien bei atmosphärischem Druck ist bekannt, dass Perchloratsalze die strukturelle Stabilität von  $\alpha$ -CT verringern. Es kann daher sein, dass hohe Drücke diesen negativen Struktureffekt teilweise rückgängig machen, was sich in einem stärkeren proportionalen Anstieg von  $k_{\text{cat}}$  äußert. Im Wesentlichen wird der destabilisierende Salzeffekt bei höheren Drücken geringer, was zu einer größeren als der erwarteten Aktivitätszunahme führen kann. Dies deutet auf die Existenz einer vorteilhaften Salz-Druck-Aktivitäts-Wirkung hin. Die Verschiebung der Grenzlinien von  $\alpha$ -CT im Druck-Temperatur-Stabilitätsdiagramm zu niedrigeren Drücken und Temperaturen mit zunehmender  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ -Konzentration deutet ebenfalls darauf hin, dass sich der Bereich der höchsten Stabilität gleichzeitig auch nach links verschiebt. Es ist interessant darauf hinzuweisen, dass die Stabilitätsmaxima der meisten Proteine in dem Temperaturbereich liegen, in dem Leben möglich ist, was auf die besondere Temperaturabhängigkeit der spezifischen Entfaltungswärme der Proteine zurückzuführen ist.<sup>[96]</sup>

Die Kurvenverläufe der Druck-Temperatur-Phasendiagramme der meisten Proteine ähneln dem Verlauf der Lebensfähigkeit von Organismen, während Lipide und Nukleinsäuren im Regelfall lineare Druck-Temperatur-Phasendiagramme besitzen.<sup>[268,269]</sup> Durch das Hinzufügen einer z-Achse in Abbildung 7-5, die die freie Energie der Entfaltung repräsentiert ( $\Delta G_u^\circ$ ), kann der Phasenraum der Proteinstabilität auch in Abhängigkeit der freien Energie dargestellt werden. In diesem Phasenraum würde  $\alpha$ -CT ein Stabilitätsmaximum aufweisen, das bis zu den gemessenen

Entfaltungsdrücken und -temperaturen absinkt, wobei  $\Delta G_u = 0$  ist. Es wäre interessant zu wissen, wie die Perchloratsalze die Position des Stabilitätsmaximums beeinflussen. Anhand der Grafik kann angenommen werden, dass das untersuchte Perchloratsalz das Stabilitätsmaximum zu niedrigeren Temperaturen verschiebt. Würde es auch die Region der maximalen Lebensfähigkeit verschieben? Wenn ja, würde dies darauf hindeuten, dass das Leben in Perchlorat-Laken günstiger ist, wenn es ebenfalls erhöhten Druck und niedrigere Temperaturen erfährt (eine ähnliche Beziehung zwischen Salzgehalt, Druck und Temperatur bezüglich des Wachstums von *Halomonas species* wurde von KAYE und BRASS beschrieben).<sup>[270]</sup> In diesem Zusammenhang ist es von großem Interesse, dass solche Umgebungen auf dem Mars potenziell beobachtet wurden.<sup>[64,248,271]</sup> Während also konzentrierte Perchlorat-Laken die Habitabilität eines wässrigen Milieus reduzieren, können hohe Drücke und niedrigere Temperaturen dem schädlichen Perchlorat-Effekt entgegenwirken und so die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöhen. Es gibt bereits vorläufige Hinweise dafür, dass Temperaturen unter 0 °C die Überlebenswahrscheinlichkeit von Bakterien in Perchlorat-Laken vergrößert.<sup>[272]</sup>

Während die Auswirkungen von niedrigen Temperaturen auf dieses Modellenzym in Gegenwart von Perchloratsalzen unbekannt bleiben, wurde gezeigt, dass hohe Drücke die Enzymaktivität selbst in Gegenwart eines destabilisierenden Salzes, dessen Konzentration auf dem Mars vorhergesagt wird, noch erhöhen kann. Darüber hinaus können hohe Drücke eine größere strukturelle Stabilität verleihen und die destabilisierende Wirkung von Perchloratsalzen auf Proteine verringern. Es wäre von besonderem Interesse, das Verständnis des Perchlorat-Druck-Temperatur-Effekts auf Membranproteine zu erweitern, da diese zusätzlich zu den sekretierten Biomolekülen direkt der perchloratreichen Umgebung ausgesetzt sind. Daher könnte der Effekt, den konzentrierte Perchloratsalze auf Prozesse, wie den molekularen Transport und die Signaltransduktion ausüben, von besonderer Bedeutung für die Habitabilität sein. Schließlich könnten, ähnlich wie im Fall der Enzyme extrem halophiler Archaeen, die enormen Mengen an anorganischen Salzen ausgesetzt sind<sup>[93]</sup>, Änderungen der Aminosäurezusammensetzung, z. B. durch Änderung des Verhältnisses von negativ zu positiv geladenen und hydrophoben Resten<sup>[93]</sup>, bei der Optimierung der Enzymaktivität unter solch extremen Salzkonzentrationen helfen.

## **8. Optimierung der Formiatdehydrogenase-Aktivität durch Cosolute, Temperatur und Druck**

### 8.1 Einleitung

NAD<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenasen stellen eine wichtige Klasse von Enzymen für essentielle Stoffwechselvorgänge dar, deren katalysierte Reaktionen für die industrielle Produktion von Bedeutung sind und zu einer der am meisten untersuchten Proteinfamilien gehören. Die Formiatdehydrogenase (FDH) hat sich als eines der geeignetsten und einfachsten Modelle zur Untersuchung des allgemeinen Katalysemechanismus des Hydridionentransfers erwiesen.<sup>[8]</sup> Dabei katalysiert FDH, das im Allgemeinen als Homodimer ohne gebundene Metallionen oder prosthetische Gruppen vorliegt,<sup>[273]</sup> die Oxidation vom Formiatanion zu Kohlenstoffdioxid bei gleichzeitiger Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH (Abbildung 8-1a). Zu den wichtigsten industriellen Anwendungen von FDH zählen die CO<sub>2</sub>-Fixierung<sup>[9,10]</sup> und das Nicotinamid-Recycling.<sup>[7,11]</sup> Der hohe Verbrauch an Cofaktoren wie NADH oder NADPH in industriell relevanten Enzymsystemen ist mit erheblichen Kosten verbunden.<sup>[7]</sup> Um diese Kosten zu minimieren, beziehungsweise den Prozess wirtschaftlich rentabler zu gestalten, wurde in den letzten Jahren intensiv an der FDH-Reaktion geforscht.<sup>[274–276]</sup> Allerdings weist das Enzym einige Nachteile hinsichtlich der chemischen, thermischen sowie langfristigen Stabilität, der hohen Produktionskosten nativer FDH und ihrer mangelhaften katalytischen Effizienz auf.<sup>[11,277]</sup> Zur Verbesserung von Enzymeigenschaften hat sich das *Protein engineering* in Form von *rational design* und *directed evolution* etabliert.<sup>[7,11,278,279]</sup>

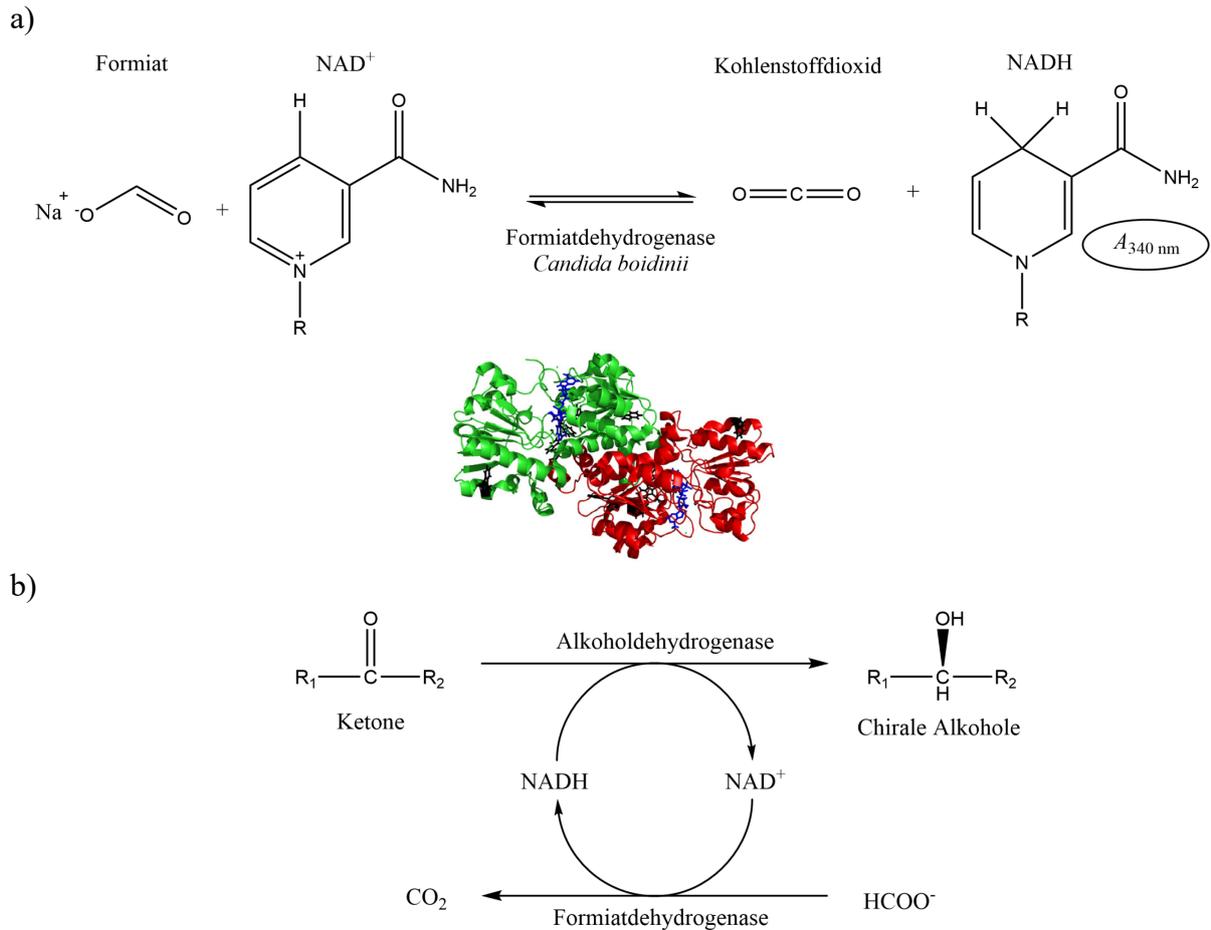


Abbildung 8-1: a) Formiatdehydrogenase (PDB: 5DN9, + NAD<sup>+</sup> (blau))-Reaktion von NAD<sup>+</sup> und Formiat unter Bildung der Produkte CO<sub>2</sub> und NADH. b) Schematische Darstellung eines Regenerationsprozesses von reduzierten Cofaktoren durch die FDH-katalysierte Reaktion.

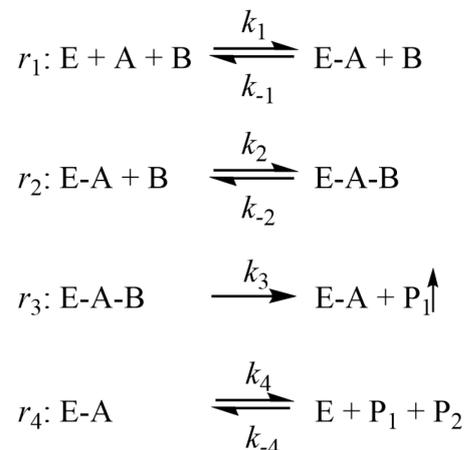
Das Hauptaugenmerk dieser Studie liegt auf der Verwendung von Umweltparametern wie Druck, Temperatur oder chemischen Additiven als zusätzliche Faktoren zur weiteren Verbesserung der operativen Stabilität und der katalytischen Effizienz dieser enzymatischen Zwei-Substrat-Reaktion. Chemische Additive, wie Osmolyte oder *Crowder*-Moleküle, können die Stabilität des Enzyms sowie die Reaktionskinetik beeinflussen, indem sie zum Beispiel die Aktivitätskoeffizienten der Substrate und Kofaktoren verändern. Ein weiterer wirkungsvoller Parameter zur Verbesserung der Stabilität und Aktivität von Enzymen ist der hohe Druck.<sup>[19,97,107]</sup> Beispielsweise bewirkt ein geringeres Volumen des Übergangszustandes des Enzym-Substrat-Komplexes im Vergleich zu den Teilvolumina der Reaktanden bei der Kompression eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit. Auch eine höhere Konformationsflexibilität kann durch Druck induziert werden, was normalerweise vorteilhaft für die enzymatische Aktivität ist oder zu einer effektiveren Substratkonformation führt.<sup>[13,98]</sup> In den letzten Jahren hat das Interesse

an der Untersuchung der Druckabhängigkeit biomolekularer Systeme stark zugenommen.<sup>[14,96,100,104]</sup> Dies ist nicht überraschend, da die Mehrheit der mikrobiellen Lebensräume auf der Erde aus der Tiefsee stammt. Bemerkenswert ist, dass unter verschiedenen Umweltbelastungen, einschließlich hoher Drücke und kalten Temperaturen, bei extremophilen Organismen verschiedene Arten von Extremolyten gefunden wurden, wie z. B. Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), die es ihren Zellen ermöglichen, unter solch harschen Umweltbedingungen zu überleben.<sup>[45,46,280–282]</sup> TMAO ist in der Lage, einem druckbedingten Funktionsverlust der biomolekularen Systeme entgegenzuwirken, einschließlich der Proteinfaltung bei hohen hydrostatischen Drücken.<sup>[139,192,281]</sup> Makromoleküle stellen eine weitere Klasse von gelösten Stoffen dar, die die Konformationsstabilität und die strukturellen Eigenschaften von Proteinen und biologischen Gleichgewichten in der biologischen Zelle beeinflussen können.<sup>[32,172]</sup> Angesichts des enormen wissenschaftlichen Interesses an der Nachahmung intrazellulärer Bedingungen (die Volumenbesetzung der Makromoleküle im Cytosol beträgt circa 30 %)<sup>[28]</sup>, wurde die *Crowder*-Substanz Dextran als Additiv in dieser Studien mit einbezogen, um auch diesen Aspekt zu berücksichtigen. Die experimentellen Ergebnisse der cosolvensfreien Reaktion wurden mit dem thermodynamischen Modell *perturbed-chain statistical associating fluid theory* (PC-SAFT) kombiniert, um die reaktionsmedien-unabhängige MICHAELIS-Konstante ( $K_M^a$ ) zu berechnen. Anhanddessen kann der Einfluss einiger Cosolute auf die scheinbare MICHAELIS-Konstante vorhergesagt werden, um diese dann anschließend mit den experimentellen Daten vergleichen zu können.

## 8.2 Probenpräparation

Lyophilisiertes Pulver der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii*, TMAO, Dextran (10 kDa), Natriumformiat und Nicotinamidadeninukleotid ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) wurden von Sigma Aldrich erworben. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für die Kinetikuntersuchungen wurde Tris-HCl-Puffer (100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH = 7.5) verwendet. Die kinetischen Parameter ( $K_{M, \text{NAD}^+}$ , und  $k_{\text{cat}}$ ) wurden mittels der Anfangsgeschwindigkeit der Steigung der linearen Anpassung der zeitabhängigen Absorptionsdaten (bei  $\lambda = 340$  nm) bestimmt, wobei die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$  bei einer konstanten Formiatkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  variiert wurde. In ähnlicher Weise wurde  $K_{M, \text{Formiat}}$  bei gleicher Enzymkonzentration ermittelt, wobei die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$  bei einer Formiatkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  variiert wurde. Der pH-

Wert für jede Lösung wurde auf 7.5 eingestellt. Sowohl das Enzym als auch das Substrat wurden in den jeweiligen Pufferlösungen gelöst und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur entgast. Die Anfangskonzentration des Enzyms betrug für alle Messungen vor dem Einfüllen in die Probenzelle 1  $\mu\text{M}$  (0.5  $\mu\text{M}$  nach dem Mischen mit der Substratlösung). Die Enzymaktivitäten bei verschiedenen Drücken wurden mit dem Hochdruck-Stopped-Flow (HPSF)-Instrument gemessen. Die katalytische Aktivität des Enzyms wurde durch die Freisetzung des Produkts NADH verfolgt, bei der die Konzentration durch die Zunahme der optischen Absorption bei 340 nm unter Verwendung des LAMBERT-BEER'schen-Gesetzes mit dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{340\text{ nm}} = 6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  bestimmt werden kann. Der molare Extinktionskoeffizient des Produkts nimmt mit steigendem Druck leicht zu ( $\sim +230\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}\text{ kbar}^{-1}$ ). Die Temperatur wurde bei allen Messungen über einen externen Wasserkreislauf konstant bei 25 °C gehalten und der Druck bis auf 2 kbar erhöht. Nach Erreichen des gewünschten Drucks wurden die Proben 5 min lang äquilibriert. Das System und die Funktion des Hochdruck-Stopped-Flow-Instruments sind in Kapitel 2.1.2 Experimentelles ausführlich beschrieben. Die FDH-Reaktion folgt einem „bi-bi“-Mechanismus, der aus vier elementaren Reaktionsschritten besteht:<sup>[283]</sup>



mit E = FDH, A =  $\text{NAD}^+$ , B = Formiat,  $\text{P}_1 = \text{CO}_2$ ,  $\text{P}_2 = \text{NADH}$ . Die Kinetik kann wie folgt beschrieben werden:<sup>[283]</sup>

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [\text{A}] \cdot [\text{B}]}{K_{iA} \cdot K_{M,B} + K_{M,B} \cdot [\text{A}] + K_{M,A} \cdot [\text{B}] + [\text{A}] \cdot [\text{B}]} \quad 8-1$$

wobei  $K_{(M,A)}$  die Bindungskonstante von A an E,  $K_{(M,B)}$  die Bindungskonstante von B an E,  $K_{(iA)}$  die Dissoziation von EA,  $v_{\max}$  die maximale Geschwindigkeit, [A] die molare Konzentration von  $\text{NAD}^+$  und [B] die molare Konzentration von Formiat beschreibt.

Unter den hier verwendeten Bedingungen (aufgrund des Überschusses an Formiat liegt das Gleichgewicht auf Seiten des EB-Komplexes, aufgrund der hohen Affinität von  $\text{NAD}^+$  liegt das Gleichgewicht auf Seiten des E- $\text{NAD}^+$ -Komplexes) wurde die Auswertung mittels der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung (Gl. 2-2) durchgeführt, um die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  und die MICHAELIS-Konstanten ( $K_{\text{M,Formiat}} = (k_{-2}+k_3)/k_2$ ,  $K_{\text{M,NAD}^+} = (k_{-1}+k_2)/k_1$ ) zu bestimmen. Das Verhältnis von  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  beschreibt die katalytische Effizienz. Nach der Theorie von EYRING ist das Aktivierungsvolumen,  $\Delta V^\ddagger$ , mit der Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit, und das Bindungsvolumen,  $\Delta V_{\text{b}}$ , mit der Änderung der MICHAELIS-Konstante in Abhängigkeit des Druck verbunden.<sup>[13,19]</sup>

$$\text{a) } \left( \frac{\partial \ln \left( \frac{k}{k_0} \right)}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT}; \text{ b) } \left( \frac{\partial \ln K_{\text{M}}^{-1}}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V_{\text{b}}}{RT} \quad 8-2$$

( $p$  = Druck,  $T$  = Temperatur,  $R$  = ideale Gaskonstante,  $v = k$  = Reaktionsgeschwindigkeit,  $k_0$  = Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Referenzdruck, hier 1 bar).

Das Aktivierungsvolumen beschreibt die Volumendifferenz des Übergangszustandes ( $\text{ES}^\ddagger$ ) und des Grundzustandes ( $\text{ES}$ ) des Enzym-Substrat-Komplexes. Das Bindungsvolumen stellt die Volumendifferenz des ES-Komplexes ( $\text{ES}$ ) bzw. des Reaktanzendzustands ( $\text{E}+\text{S}$ ) dar. Aufgrund der unterschiedlichen Kompressibilität der Reaktanden, des ES-Komplexes und des Übergangszustandes können  $\Delta V^\ddagger$ -Werte positiv oder negativ sein. Bei einer Zwei-Substrat-Reaktion mit einem ternären Komplexmechanismus ist die Interpretation von  $\Delta V^\ddagger$  komplizierter.<sup>[13]</sup>

Die Aktivierungsenergie der Reaktion,  $E_{\text{a}}$ , ist über die ARRHENIUS-Gleichung mit der Geschwindigkeitskonstante der Katalyse verknüpft:

$$k_{\text{cat}} = A e^{-\frac{E_{\text{a}}}{RT}} \quad 8-3$$

( $A$  = präexponentieller Faktor) und kann aus der Steigung der linearen Regression der Kurve von  $\ln(k_{\text{cat}})$  gegen  $1/T$  erhalten werden.

Prinzipiell kann für die experimentelle Bestimmung von  $K_{\text{M}}$  ein starker Einfluss der Reaktionsbedingungen (u. a. Druck, pH, Temperatur, Cosolute) beobachtet werden.<sup>[284,285]</sup> Diese Beobachtung spiegelt sich auch in einigen Ergebnissen in dieser Arbeit wider. Diese Tatsache beruht teilweise auch auf den nicht-idealen Eigenschaften (*non-idealities*) der Flüssigkeitsgemische, die durch die thermodynamische Aktivitäten ihrer Komponenten hervorgerufen wer-

den. Für einen aktivitätsbasierten Ansatz müssen für die Komponenten Aktivitäten verwendet werden.<sup>[286]</sup> Unter der Annahme, dass die molalitätsbasierten Aktivitätskoeffizienten des Enzyms und des ES-Komplexes gleich sind, gilt für die thermodynamisch aktivitätsbasierende MICHAELIS-Konstante,  $K_M^a$ , in Relation zur experimentell bestimmten MICHAELIS-Konstante,  $K_M$ :<sup>[286]</sup>

$$K_M^a = K_M \cdot \gamma_S \quad 8-4$$

Somit beschreibt  $K_M^a$  im Gegensatz zu  $K_M$  einen Wert, der unabhängig von Änderungen im Reaktionsmedium ist und die Vorhersage von  $K_M$  durch Cosolut-induzierten Änderungen erlaubt. Der Aktivitätskoeffizient des Substrates,  $\gamma_S$ , berücksichtigt das nicht-ideale Verhalten des Flüssigkeitsgemisches, das durch schwache Wechselwirkungen des Substrats mit den Komponenten im Reaktionsgemisch hervorgerufen wird.

Druckabhängige FTIR-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Julian Pietrzak mit einem MAGNA 550 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Enzym FDH unter Verwendung einer Amicon Ultra-Zentrifugationseinheit mit einer Porengröße von 10 kDa gegen D<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend lyophilisiert. Für die druckabhängigen FTIR-Studien wurden die Messungen in 100 mM Tris-Puffer durchgeführt. Der pH-Wert des Puffers wurde durch Zugabe von DCl auf 7.1 eingestellt. Im Kapitel 2.2.2 Experimentelles wird die Messzelle sowie die Durchführung und Auswertung des Versuchs im Detail erläutert.

### 8.3 Ergebnisse und Diskussion

Mithilfe des Hochdruck-Stopped-Flow-Systems wurde die enzymatische Aktivität der Zwei-Substrat-Enzymreaktion im Multiparameterraum untersucht, der die Parameter Druck (1 bis 2000 bar), Temperatur (25- 45 °C) sowie verschiedene Arten von Cosoluten, darunter makromolekulare *Crowder* (Dextran) und Cosolventien (TMAO, Harnstoff), umfasst. Abbildung 8-2 zeigt die MICHAELIS-MENTEN-Plots für die durch FDH katalysierte Redoxreaktion von NAD<sup>+</sup> und Formiat bei verschiedenen Temperaturen (Abbildung 8-2A,C,E) und in verschiedenen Pufferlösungen bei 25 °C (Abbildung 8-2B,D,F).

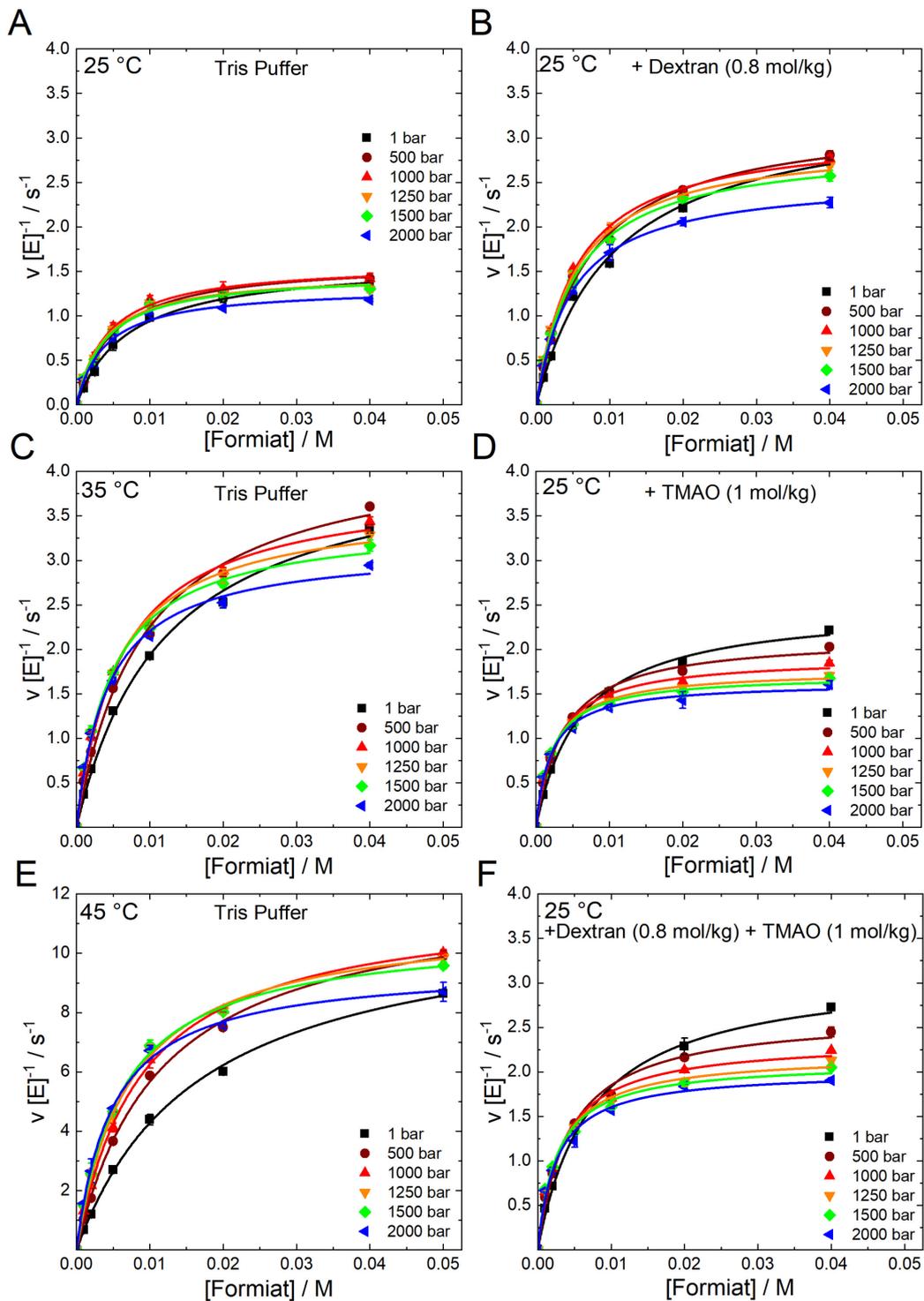


Abbildung 8-2: MICHAELIS-MENTEN-Plots der Enzymreaktion von FDH bei verschiedenen Substratkonzentrationen,  $[\text{Formiat}]$ , und Drücken,  $p$ : In reinem Puffer bei verschiedenen Temperaturen (A,C,E) und in reinem Puffer in Anwesenheit von  $0.8 \text{ mol kg}^{-1}$  Dextran (B),  $1 \text{ mol kg}^{-1}$  TMAO (D) und  $0.8 \text{ mol kg}^{-1}$  Dextran +  $1 \text{ mol kg}^{-1}$  TMAO (F) bei 25 °C.

Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt bei allen Substratkonzentrationen mit steigender Temperatur deutlich zu. Zunehmender Druck hat keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Abnehmende Tendenzen der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmendem Druck sind lediglich in Anwesenheit von TMAO zu erkennen. In den anderen Versuchsreihen (Abbildung 8-2A,B,C,F) ist für alle Substratkonzentrationen bis etwa 1 kbar ein leichter Anstieg der Enzymaktivität zu beobachten. Oberhalb dieses Drucks nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab. In Anwesenheit von  $0.8 \text{ mol kg}^{-1}$  Dextran ist ein zusätzlicher Anstieg der Geschwindigkeit der Enzymreaktion im Vergleich zur reinen Pufferlösung zu beobachten (Abbildung 8-2B).

In Abbildung 8-3 ist die Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter (MICHAELIS-Konstante, Wechselzahl und katalytische Effizienz) für die FDH-Reaktion bei verschiedenen Temperaturen (Abbildung 8-3A,C,E) und in verschiedenen Pufferlösungen (Abbildung 8-3B,D,F), bezogen auf das Substrat Formiat, dargestellt.  $K_{M, \text{Formiat}}$  nimmt mit steigendem Druck, auch bei höheren Temperaturen, ab, d. h. die Affinität des Substrats nimmt mit steigendem Druck leicht zu. Bei höheren Temperaturen nimmt der  $K_M$ -Wert jedoch deutlich zu, bzw. die Affinität ab. Dies ist wahrscheinlich aufgrund der höheren Konformationsdynamik des Proteins bei hohen Temperaturen zu erklären. Mit zunehmender Temperatur zeigen  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{eff}}$  einen drastischen Anstieg. Bei einem Temperaturanstieg von 25 auf 45 °C steigen die  $k_{\text{cat}}$ -Werte etwa um das Sechs- bis Achtfache und  $k_{\text{eff}}$  um den Faktor drei bis fünf. Als Konsequenz der druckinduzierten Abnahme von  $K_M$  und des durch Druck nicht wesentlich beeinflussten  $k_{\text{cat}}$ -Wertes werden höhere Werte für die katalytische Effizienz beobachtet. Ein ähnliches Verhalten kann auch bei den verschiedenen Pufferlösungen für  $k_{\text{eff}}$  beobachtet werden.

Die größte enzymatische Effizienz wurde für die  $1 \text{ mol kg}^{-1}$  TMAO-Lösung bei 25 °C beobachtet. In Gegenwart von Dextran und TMAO nimmt die Wechselzahl von 1 bis 2000 bar geringfügig ab und in Gegenwart von TMAO weist  $K_{M, \text{Formiat}}$  den niedrigsten Wert im gesamten untersuchten Druckbereich auf. Es ist bekannt, dass TMAO die Fähigkeit besitzt, bevorzugt mit Wasser zu interagieren, was zu einer Erhöhung der Wasserstoffbrückenbindungsanzahl und Strukturierung des Lösungsmittels führt, jedoch wird TMAO von der Proteinoberfläche weitgehend ausgeschlossen (*excluded volume* Effekt).<sup>[100,114]</sup> Aufgrund dieses indirekten Effekts konnte bei einigen monomeren Proteinen eine erhöhte Temperatur- und Druckstabilität beobachtet werden.<sup>[139,222,223]</sup> Vorteilhafte Effekte von TMAO wurden auch auf die Enzymfunktion, die Proteinpolymerisation sowie die Kanalaktivität unter Hochdruckstress berich-

tet.<sup>[22,98,225,287]</sup> Die Verringerung des  $K_M$ -Wertes in Anwesenheit von TMAO kann ferner dadurch erklärt werden, dass die Fluktuationen des Proteinerückgrats durch den Piezolyten abgeschwächt werden und die kompakteste und aktivste Enzymkonformation, auch bei hohen Drücken, begünstigt wird.<sup>[288]</sup>

0.8 mol kg<sup>-1</sup> Dextran zeigt einen negativen Effekt auf die MICHAELIS-Konstante. In Anwesenheit von Dextran konnten bei anderen Enzymreaktionen unterschiedliche Effekte beobachtet werden, wobei die Effekte von der Größe<sup>[289]</sup> und Konzentration des *Crowders*<sup>[290]</sup> und der Größe des Enzyms abhängen.<sup>[291]</sup> In diesem Fall wurde eine geringe Größe (10 kDa) und 13 gew.-% Dextran verwendet, was den Diffusionswiderstand in der Probe erhöhen oder die Aktivitätskoeffizienten des freien Substrats in der Lösung beeinflussen könnte.

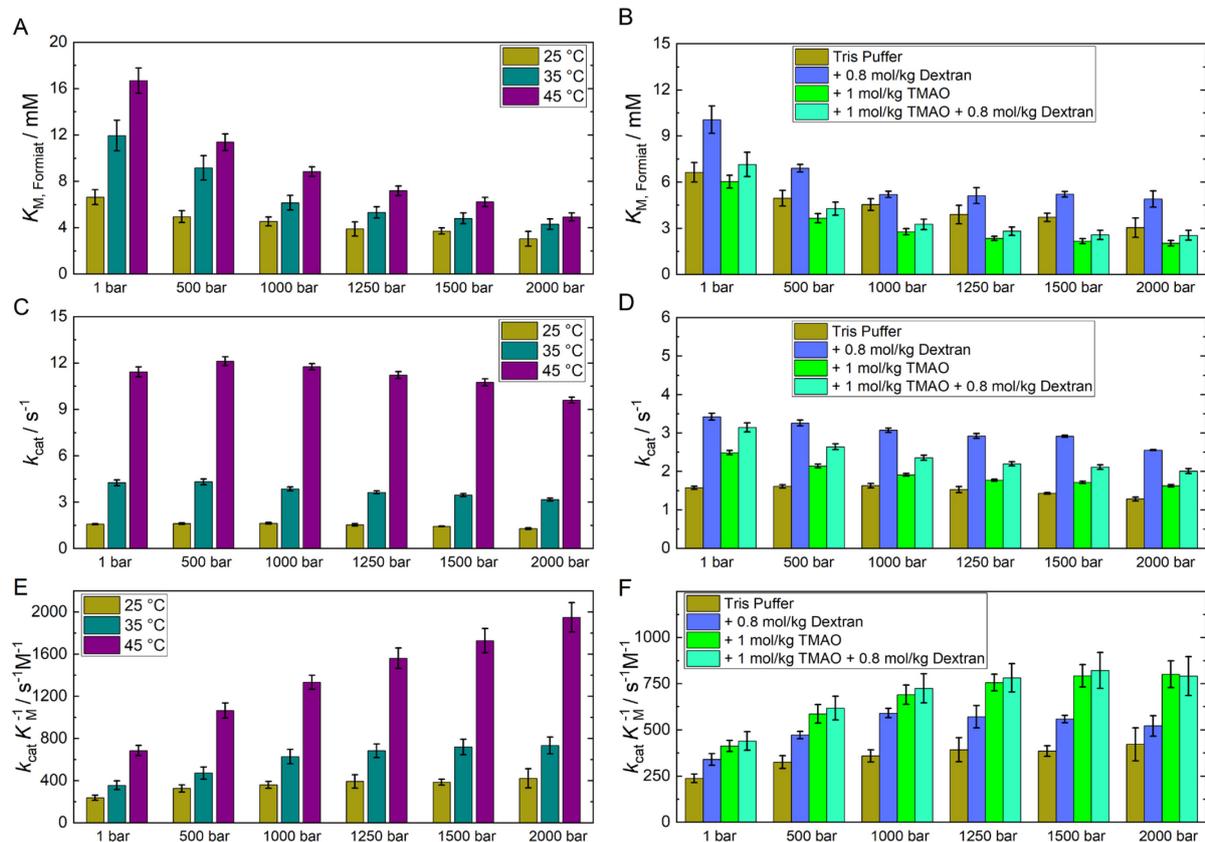


Abbildung 8-3: Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter für die durch FDH katalysierte Redoxreaktion von NAD<sup>+</sup> und Formiat bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Lösungen ermittelt, wobei nur die Formiatkonzentration geändert wurde: A/B) MICHAELIS-Konstante; C/D) Wechselzahl; E/F) katalytische Effizienz.

Die drastischsten Auswirkungen von Dextran und TMAO stehen näherungsweise mit den PC-SAFT-Berechnungen im Einklang (Abbildung 8-4, Tabelle 8-1). Für 1 mol kg<sup>-1</sup> TMAO sind die Vorhersagen innerhalb der experimentellen Unsicherheit sogar quantitativ zutreffend. Hingegen ist die Prognose für den Effekt in Anwesenheit von Dextran deutlich höher als experimentell ermittelt, welches jedoch an der unterschiedlichen Größe des *Crowder*-Moleküls (40 kDa ↔ 10 kDa) liegen könnte. Bemerkenswert ist, dass sich im experimentellen Versuch herausstellte, dass TMAO dem verschlechternden Effekt von Dextran entgegenwirkt, während in der *in situ*-Modellierung der Dextran-Effekt dominiert.

*Tabelle 8-1*: Mittels PC-SAFT, bereitgestellt von **CHRISTOPH HELD**, ermittelte Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M^a$ ) und Aktivitätskoeffizient des jeweiligen Cosolutes ( $\gamma_s$ ) für die formiatabhängige FDH-Reaktion bei dem niedrigsten und höchsten untersuchten Drücken bei  $T = 25$  °C.

	$p$ / bar	$K_M^a$ / mM	$\gamma_s$
Tris-Puffer	1	0.02372	3.578
	2000	0.00913	3.004
+ 1 mol kg <sup>-1</sup> TMAO	1	0.02372	5.255
	2000	0.00913	4.459
+ 1 mol kg <sup>-1</sup> Dextran (40 kDa)	1	0.02372	1.540
	2000	0.00913	1.793
+ 1 mol kg <sup>-1</sup> TMAO + 1 mol kg <sup>-1</sup> Dextran (40 kDa)	1	0.02372	1.555
	2000	0.00913	1.738
+ 1 mol kg <sup>-1</sup> Harnstoff	1	0.02372	4.318
	2000	0.00913	3.628

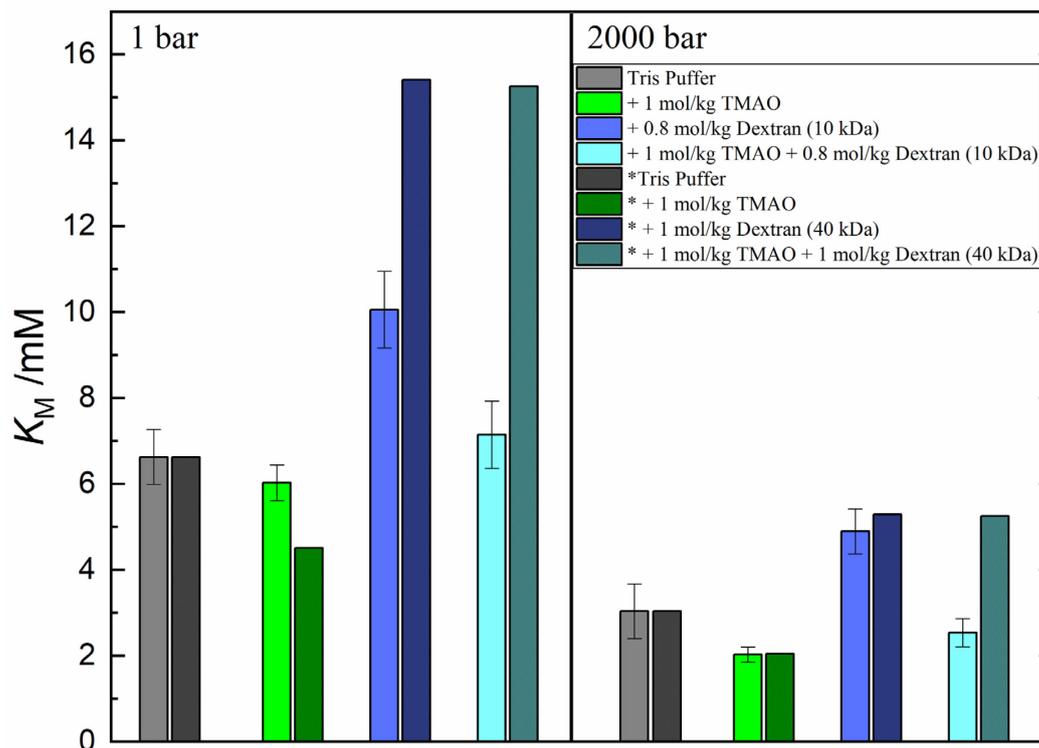


Abbildung 8-4: Vergleich zwischen den gemessenen  $K_M$  (hellere Balken) bei 25 °C und den vorhergesagten MICHAELIS-Konstanten  $K_M^a$  (dunklere Balken) mittels PC-SAFT<sup>[94,292]</sup>, bereitgestellt von **CHRISTOPH HELD**.

Interessanterweise konnte in Gegenwart von Harnstoff keine MICHAELIS-MENTEN-Analyse durchgeführt werden (Abbildung i-11). Die Aktivität von FDH scheint in der Gegenwart von 0.5 mol kg<sup>-1</sup> Harnstoff signifikant beeinträchtigt zu sein. Die Abnahme der funktionellen Aktivität durch Harnstoff kann durch einen direkten Interaktionsmechanismus erklärt werden. Einerseits kann die direkte Interaktion zwischen Harnstoff und dem Proteinrückgrat sowie seinen Seitenketten das Konformationsgleichgewicht zu offeneren und weniger aktiven Konformationen verschieben. Andererseits kann vermutet werden, dass Harnstoff mit den Substraten interagiert oder die aktive Tasche des Enzyms blockiert.<sup>[130,280,281,293]</sup>

Abbildung i-8 zeigt die Druckabhängigkeit der Aktivierungsenergie  $E_a$ , die sich aus dem ARRHENIUS-Diagramm ( $\ln(k_{cat})$  vs.  $1/T$ ) gemäß Gl. 8-3 ergibt. Bei allen Drücken konnte festgestellt werden, dass die FDH-katalysierte Reaktion mit einem  $E_a$ -Wert von  $80 \pm 8$  kJ mol<sup>-1</sup> assoziiert ist.

Interessanterweise steigt die Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Druckanstieg bis zu 1 kbar an. Mittels Gl. 8-2a konnte für alle Lösungsbedingungen und Temperaturen in diesem Druckbereich ein negatives Aktivierungsvolumen bestimmt werden (Abbildung i-9, Abbildung i-10). In reinem Puffer beträgt  $\Delta V^\ddagger$   $-9.3 \text{ mL mol}^{-1}$ , was in guter Übereinstimmung mit der Literatur ist.<sup>[294]</sup> Darüber hinaus zeigen die Abbildung i-9 und Abbildung i-10, dass das Aktivierungsvolumen mit zunehmender Substratkonzentration etwas positiver wird und für hohe Substratkonzentrationen Plateauwerte erreicht. In diesem Fall beschreibt das Aktivierungsvolumen die Differenz zwischen den Volumina des Übergangszustandes ( $\text{ES}^\ddagger$ ) und des Enzym-Substrat-Komplexes (ES). Somit ist das Volumen des Übergangszustands kompakter als das Volumen des ES-Komplexes, was auf die Füllung des Hohlraumvolumens, Hydratationsänderungen und kleinere Konformationsänderungen innerhalb der aktiven Tasche des Enzyms im Verlauf der Reaktion zurückgeführt werden kann.  $\Delta V^\ddagger$  wird mit steigender Temperatur negativer, was auf eine weitere Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei Druckausübung hinweist.

Bei niedrigen Substratkonzentrationen, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit auch von der MICHAELIS-Konstante abhängt, beinhaltet  $\Delta V^\ddagger$  auch die Volumenänderung bei der Substratbindung. Aus Gl. 8-2b kann das Bindungsvolumen  $\Delta V_b$  bestimmt werden, dass hier etwa  $-9$  bis  $-15 \text{ mL mol}^{-1}$  beträgt. Diese Daten zeigen, dass die Reaktanden ein größeres partielles Molvolumen in Vergleich zum ES-Komplex besitzen.

Aufgrund der Abnahme der Anfangsgeschwindigkeit mit steigendem Druck (oberhalb von  $\sim 1000$ ) werden positive Werte für das Aktivierungsvolumen erhalten. Im Falle einer Zwei-Substrat-Reaktion kann es dazu kommen, dass sich ab einem bestimmten Druck der anfänglich geschwindigkeitsbestimmende Schritt ändert, z. B. von  $k_2$  auf  $k_3$ , oder dass  $k_3$  nicht mehr vernachlässigt werden kann. Möglicherweise ist das Aktivierungsvolumen nicht druckunabhängig, d. h. ein Kompressibilitäts-Term sollte herangezogen werden.

Tabelle 8-2 fasst die kinetischen Parameter der FDH-Reaktion für beide Substrate (Variation einer Substratkonzentration, wobei die andere Substratkonzentration konstant bleibt) in reinem Puffer zusammen. Bei Betrachtung der MICHAELIS-Konstante kann festgestellt werden, dass der  $K_M$ -Wert für  $\text{NAD}^+$  deutlich niedriger ist (Faktor 200 bei 1 bar), was auf eine viel höhere Affinität des Substrats hindeutet. Während bei der FDH-Reaktion  $K_{M, \text{Formiat}}$  mit steigendem Druck abnimmt, zeigt  $K_{M, \text{NAD}^+}$  ein Minimum bei 1 kbar. Jedoch ändert sich die MICHAELIS-Konstante von  $\text{NAD}^+$  bei Kompression nicht signifikant. Erwartungsgemäß ist die Wechselzahl

der Reaktion für beide Substrate und der Trend bei einem Druckanstieg bis zu 2 kbar nahezu gleich. Infolge der unterschiedlichen MICHAELIS-Konstanten konnte für die NAD<sup>+</sup>-abhängige Reaktion eine wesentlich höhere katalytische Effizienz bestimmt werden, wobei das Optimum bei 1 kbar liegt. Bei Atmosphärendruck (1 bar) werden in der Literatur ähnliche Werte für die MICHAELIS-Konstante und die Wechselzahl angegeben.<sup>[7,279]</sup>

*Tabelle 8-2:* Vergleich der kinetischen Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{eff}$ )) der FDH-Reaktion für beide Substrate bei allen Drücken in reinem Puffer ( $T = 25\text{ °C}$ ).

	$p / \text{bar}$	Variierende [Formiat], [NAD <sup>+</sup> ] = konstant	Variierende [NAD <sup>+</sup> ], [Formiat] = konstant
$K_M / \mu\text{M}$	1	6630 ± 634	32.83 ± 3.89
	500	4951 ± 504	27.41 ± 2.25
	1000	4548 ± 381	21.94 ± 2.31
	1250	3892 ± 606	23.52 ± 1.51
	1500	3711 ± 272	25.31 ± 0.97
	2000	3040 ± 635	30.25 ± 3.71
$k_{cat} / \text{s}^{-1}$	1	1.573 ± 0.040	2.043 ± 0.070
	500	1.610 ± 0.044	2.071 ± 0.046
	1000	1.630 ± 0.057	1.946 ± 0.050
	1250	1.526 ± 0.080	1.906 ± 0.031
	1500	1.426 ± 0.018	1.807 ± 0.018
	2000	1.281 ± 0.051	1.570 ± 0.054
$k_{eff} / \text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$	1	237.3 ± 23.5	62229 ± 7671
	500	325.2 ± 34.3	75585 ± 6423
	1000	358.9 ± 32.6	88678 ± 9610
	1250	392.2 ± 64.4	81045 ± 5365
	1500	384.4 ± 28.6	71386 ± 2829
	2000	421.4 ± 89.5	51907 ± 6608

Um die beobachteten kinetischen Veränderungen der enzymatischen Aktivität oberhalb von ~1 kbar aufzuklären, wurden druckabhängige FTIR-Spektroskopiemessungen von FDH durchgeführt, um mögliche sekundäre Strukturveränderungen des Enzyms bei Druckeinwirkung zu bestimmen. Abbildung 8-5 veranschaulicht die Auswirkung des Drucks auf die Amid-I'-Bande und den prozentualen Anteil der Sekundärstrukturelemente von FDH, die aus der Kurvenanpassungsanalyse abgeleitet wurden. Hierbei wurde ein Druckbereich zwischen 1 bar und 10000 bar (1 GPa) gewählt. Die Amid-I'-Bande von FDH verschiebt sich bei Druckeinwirkung zu niedrigeren Wellenzahlen (Abbildung 8-5A). Interessanterweise wird mit steigendem Druck eine leichte Abnahme des prozentualen Anteils der  $\alpha$ -Helices (~ -6 %) beobachtet, während der

prozentuale Anteil der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter im Bereich von 1 bar bis 3 kbar gleichzeitig zunimmt ( $\sim +7\%$ ). Diese Resultate deuten auf eine geringfügige Konformationsänderung, möglicherweise in der aktiven Tasche oder dem Substratkanal, hin, was die Ursache für die Abnahme der enzymatischen Aktivität bei höheren Drücken sein kann.

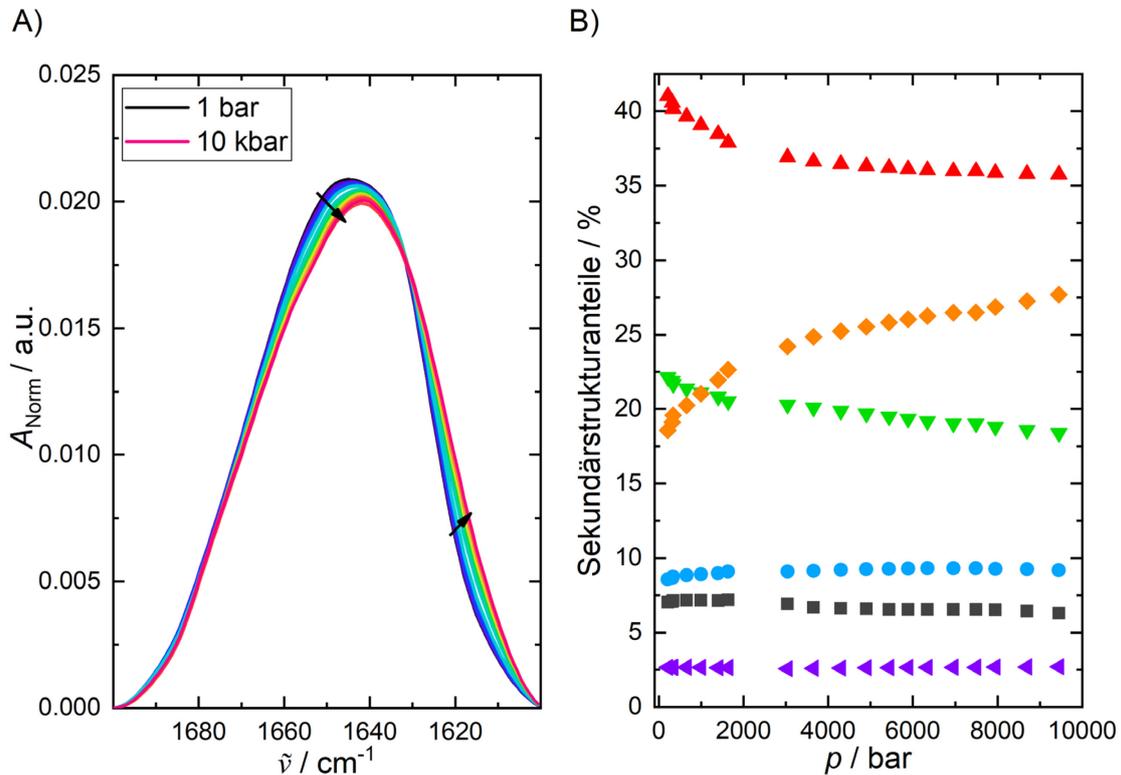


Abbildung 8-5: Druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von FDH in Tris-Puffer bei 25 °C. A) Druckabhängige Änderungen der normierten Amid-I'-Bandenregion von FDH und B) die entsprechenden Änderungen der Sekundärstrukturelemente:  $\beta$ -Faltblätter (1678  $\text{cm}^{-1}$ , grau), Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ , hellblau),  $\alpha$ -Helices (1650 & 1658  $\text{cm}^{-1}$ , rot), ungeordnete Strukturen (1640  $\text{cm}^{-1}$ , grün),  $\beta$ -Faltblätter (1630  $\text{cm}^{-1}$ , orange) und Seitenketten (1612  $\text{cm}^{-1}$ , violett).

## 8.4 Zusammenfassung

Die Studie offenbarte für das industrie-relevante Enzymsystem FDH, dass neben der heutzutage häufig verwendeten Vorgehensweise des *Protein engineering*, die Anwendung der Parameter wie Druck, Temperatur und chemischer Additive in ökonomischer Hinsicht für die Optimierung einiger Proteineigenschaften hilfreich sein kann. Der Einsatz des Drucks und der Temperatur zeigte eine Beschleunigung der enzymatischen Zwei-Substrat-Reaktion, die sich vor allem in der Verbesserung der katalytischen Effizienz widerspiegelt. In Anwesenheit der untersuchten Cosolute konnte bei 1 mol  $\text{kg}^{-1}$  TMAO die höchste katalytische Effizienz ermittelt werden. Wie

aus den Daten zu erkennen ist, kann mithilfe des vorgestellten Modellierungsansatzes für diese Enzymreaktion aus den aktivitätsbasierten, kinetischen Parametern eine quantitative Vorhersage des Cosoluteinflusses auf die MICHAELIS-Konstante getroffen werden. Zudem beschreibt die MICHAELIS-Konstante  $K_M^a$  einen Wert, der unabhängig von den eingesetzten Cosoluten und dessen Konzentration ist, währenddessen der Cosolut-Effekt auf  $K_M$  hauptsächlich durch den Einfluss des Cosolutes auf den Aktivitätskoeffizienten des Substrats Formiat verursacht wird.<sup>[286]</sup> Jedoch gilt dieser Einfluss nicht für Harnstoff, da sich die Resultate zwischen dem aktivitätsbasierten und dem beobachteten enzymatischen Effekt (wahrscheinlich verursacht durch die direkte Interaktion von Harnstoff mit dem Enzym) drastisch unterscheiden. Diese gewonnenen Erkenntnisse können hilfreich sein, um Cosolut-Effekte auf die MICHAELIS-Konstante von enzymkatalysierten Reaktionen zu quantifizieren. Nichtsdestotrotz müssen die Wechselwirkungen zwischen Cosolut und Enzym weiterhin berücksichtigt werden.

Ferner konnte festgestellt werden, dass die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Drucks ein biphasisches Verhalten aufweist, welches sich in der Vorzeichenänderung der Aktivierungsvolumina zeigt. Um die Stabilität von FDH bei hohen Drücken zu überprüfen, wurde die Sekundärstruktur von FDH mittels FTIR-Spektroskopie analysiert, wobei kleine Konformationsänderungen beobachtet wurden. Diese könnten für die veränderte Druckabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei Drücken oberhalb von 1 kbar verantwortlich sein. Ungeachtet dessen kann mithilfe des Drucks die thermische Inaktivierung des Enzyms zu höheren Temperaturen verschoben werden, wie bereits bei einer  $\alpha$ -Chymotrypsin-Reaktion beobachtet wurde.<sup>[295]</sup>

In dieser Studie wurden mehrere Faktoren (wie z. B. der Einsatz von chemischen Additiven, Temperaturen bis einschließlich 45 °C und Drücke bis 2 kbar) teilweise miteinander kombiniert, um eine Optimierung des Enzymsystems zu erreichen. Diese Untersuchungen decken jedoch nur einen kleinen Bereich im Multiparameterraum ab. Um die bestmögliche Ausbeute zu erzielen und die operative Stabilität von FDH zu erhöhen, sollte ein größerer Teil des Parameterraums der thermodynamischen Variablen mittels experimenteller und theoretischer Untersuchungen erforscht werden. Solche Informationen wären auch zur Optimierung anderer enzymatischer Reaktionen in zukünftigen, technologischen Anwendungen vorteilhaft.

## 9. Erforschung der enzymatischen Aktivität im Multiparameterraum: Cosolventien, makromolekulare *Crowder* und Druck

### 9.1 Einleitung

Enzyme sind die leistungsfähigsten Katalysatoren für kommerzielle Prozesse, wie z. B. in der Pharma-, Lebensmittel- und Getränkeindustrie, die hinsichtlich Nachhaltigkeit und Prozesseffizienz zahlreiche Vorteile gegenüber traditionellen chemischen Verfahren bieten. Daher ist es nicht verwunderlich, dass der globale Markt für industriell anwendbare Enzyme ständig wächst.<sup>[3]</sup> Dennoch müssen aus industrieller Sicht die Langzeitstabilität des Enzyms, die Verringerung von Energieverbrauch, Produktionskosten und Verarbeitungszeiten sowie die Ungiftigkeit und Umweltfreundlichkeit der Abfälle und eingesetzten Chemikalien weiter optimiert werden.<sup>[3,5,6]</sup> Um diese Aspekte anzugehen, befasst sich die gegenwärtige Enzymforschung hauptsächlich mit dem *Protein engineering*.<sup>[4]</sup> Auch chemische Additive und physikalisch-chemische Parameter können jedoch auch ein wirksames Hilfsmittel sein, um die Produktausbeute und die Kosteneffizienz weiter zu verbessern.

Die meisten Studien über biochemische Prozesse werden in verdünnter Lösung *in vitro* untersucht, obwohl bekannt ist, dass bis zu 30 % des Volumens im Cytosol *in vivo* von einer Vielzahl von Makromolekülen und gelösten Stoffen eingenommen werden.<sup>[28]</sup> In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass makromolekulare *Crowder* Prozesse wie Proteinfaltung,<sup>[33,296]</sup> Mobilität der Komponenten,<sup>[31,297]</sup> Assoziationseigenschaften<sup>[298,299]</sup> und enzymatische Aktivitäten<sup>[30,300,301]</sup> deutlich beeinflussen können. Um biochemische Prozesse *in vivo* zu verstehen, scheint es daher unerlässlich, molekulare Einblicke in die Wirkungsweise von makromolekularen *Crowdern* auf enzymatische Reaktionen zu erlangen, z. B. durch den Einsatz künstlicher *Crowder*, die die zelluläre Umgebung nachahmen. *Crowding* tritt in erster Linie durch Biomakromoleküle wie Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren, aber auch durch andere Beiträge, wie membranartige Organellen, Mitochondrien und Lipidvesikel, dem Cytoskelett und Ribosomen auf. Es wurde festgestellt, dass der Effekt des Volumenausschlusses (Abbildung 1-2), der durch das *Crowding* entsteht, eine entscheidende Rolle spielt.<sup>[31]</sup> Allgemein kann angenommen werden, dass das *Crowding* die Stabilität von Proteinen erhöht, da es die Konformationsentropie von entfalten Zuständen, nicht aber die des kompakten nativen Zustands, reduziert. Die Forschungsergebnisse bezüglich des Einflusses des makromolekularen *Crowdings* auf kataly-

tische Reaktionen sind recht unterschiedlich. Es wurden über erhöhte Reaktionsgeschwindigkeiten,<sup>[31,300,302,303]</sup> eine Abnahme der Enzymaktivität<sup>[290,304]</sup> oder keine wesentlichen Änderungen<sup>[27]</sup> berichtet.

Hoher Druck stellt einen weiteren wirkungsvollen Parameter zur Verbesserung der Stabilität und Aktivität von Enzymen dar.<sup>[13,19,43,55,107,305]</sup> Nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER werden erhöhte Reaktionsgeschwindigkeiten beobachtet, wenn das Volumen des Übergangszustandes des Enzym-Substrat-Komplexes kleiner ist als die Summe der molaren Teilvolumina der Reaktanden. In einigen Fällen kann durch Druckanwendung auch eine höhere Konformationsflexibilität, die in der Regel vorteilhaft für erhöhte Reaktionsgeschwindigkeiten ist, oder ein effektiverer konformationeller Zustand des Enzyms induziert werden.<sup>[13,55,305]</sup>

Neben der Temperatur und der chemischen Aktivität der Reaktanden zur Modulation der enzymatischen Reaktivität sind hohe Drücke als dritter thermodynamischer Parameter ebenfalls von biologischer Relevanz. Ein großer Teil der Organismen auf der Erde gedeiht unter hohen hydrostatischen Druckbedingungen in der Tiefsee und im Unterwasserboden, wo Drücke von 1 kbar (100 MPa) und mehr erreicht werden können.<sup>[45,190,280,281]</sup> Interessanterweise wurde bei Tiefseeorganismen auch festgestellt, dass sie über hohe Konzentrationen kompatibler Cosolventien (Osmolyte), wie Mannosylglycerat und Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), verfügen, um die Druckstabilität von Proteinen zu erhöhen und ihre Aktivität zu regulieren.<sup>[139,192,223,280,281,306]</sup> Offensichtlich können solche Extremolyte, d. h. kompatible Cosolute, die bei Extremophilen vorkommen, von besonderem Nutzen sein. Sie werden als Reaktion auf verschiedene Umweltbelastungen zu hohen Konzentrationen in den Zellen biosynthetisiert, ohne den zellulären Metabolismus zu stören, und ermöglichen es, dass ihre Wirtszellen den harschen ökologischen Bedingungen standhalten.<sup>[280–282]</sup> Hier wurde der Einfluss von Harnstoff und TMAO, die auch in Studien zur Proteinfaltung weit verbreitet sind, untersucht. Harnstoff spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus stickstoffhaltiger Verbindungen von Tieren und Menschen. Bei Tiefseeorganismen tritt dieser chaotrope Osmolyt häufig neben TMAO auf.<sup>[280,281]</sup> Hohe Konzentrationen an Harnstoff können die Stabilität von Proteinen durch direkte Wechselwirkung mit dem Rückgrat und den Seitenketten des Proteins deutlich verringern. Dagegen besitzt TMAO die Fähigkeit, funktionelle Konformationen von Proteinen zu schützen, indem es intrapeptidischen ionischen Wechselwirkungen stabilisiert und vom Proteinrückgrat ausgeschlossen wird.<sup>[307]</sup> Darüber hinaus ist TMAO in der Lage, die destabilisierende Wirkung von Harnstoff

zu kompensieren.<sup>[192,216,307]</sup> Da beide Cosolventien häufig in Tiefseeorganismen vorzufinden sind, wurden in dieser Studie beide Cosolventien verwendet.

In dieser Arbeit wurde das gut charakterisierte Modellenzym  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -CT) verwendet, um die kombinierten Effekte von makromolekularem *Crowding*, Cosolventien und Druck auf die Aktivität des Enzyms aufzuzeigen (Abbildung 9-1A). Eingesetzt wurden TMAO und Harnstoff als Vertreter der Cosolventien sowie Polyethylenglykol (PEG) und dem Polysaccharid Dextran, um das intrazelluläre makromolekulare *Crowding* nachzustellen. Dies ist nach jetzigem Kenntnisstand eine der ersten Studien, die sich mit dem oben genannten Multiparameterraum bestehend aus hohem hydrostatischen Druck (HHP), Cosolventien und *Crowdern* befasst. Das Enzym  $\alpha$ -CT ist eine Serinprotease, die Peptidbindungen, vorzugsweise aromatische Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe), hydrolysiert und zur Unterstützung bei der Proteinverdauung eingesetzt wird. In der aktiven Tasche von  $\alpha$ -CT bilden die drei Aminosäuren (Ser195, His57, Asp102) eine katalytische Triade, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind (Abbildung 9-1B).

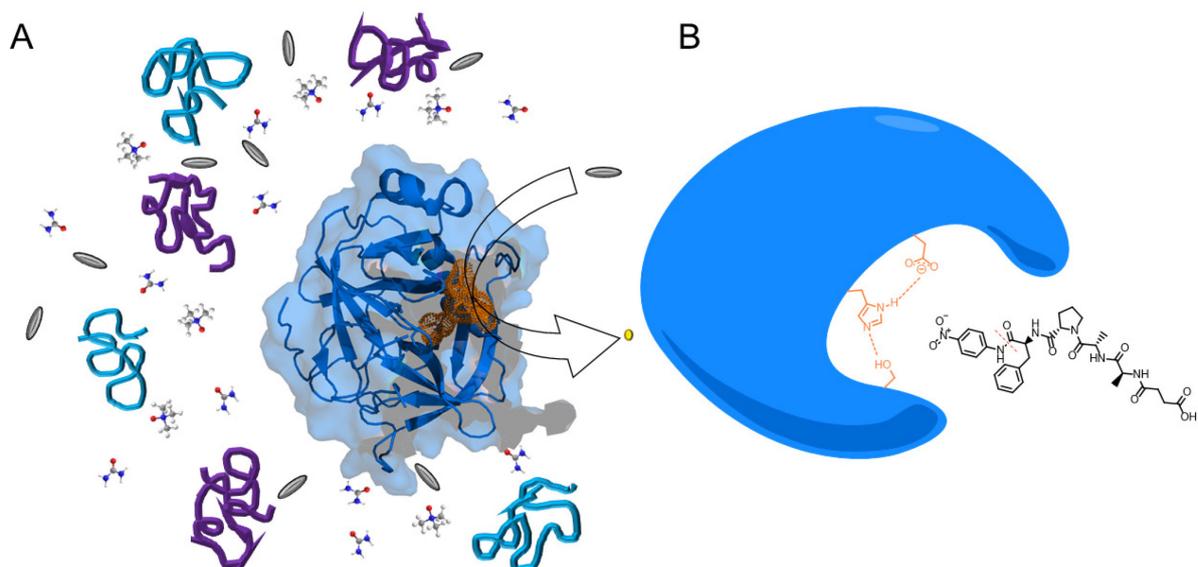


Abbildung 9-1: A) Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktion von  $\alpha$ -CT (PDB: 1YPH; Substrat (dunkelgrau); Produkt (gelb) in Gegenwart von *Crowdern* (Dextran (türkis), PEG (purpur)) und Cosolventien (TMAO und Harnstoff). B) Katalytische Triade von  $\alpha$ -CT in Gegenwart des Substrats *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid.

Dieses Enzym eignet sich besonders für kinetische Studien, da seine Druckstabilität bis zu 5 kbar gewährleistet ist<sup>[262]</sup> und Druckeffekte bis zu 4.7 kbar auf die enzymatische Aktivi-

tät nachweislich reversibel sind. Außerdem berichteten MOZHAEV *et al.* bei Kompression über eine verbesserte Stabilität gegenüber der thermischen Entfaltung und der Aktivität.<sup>[109]</sup> Als Modellreaktionssystem im Druckbereich von Umgebungsdruck bis zu 2 kbar wurde die Hydrolyse des Substrats *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid durch  $\alpha$ -CT unter Bildung der Produkte *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe und *p*-Nitroanilin ausgewählt, wobei die Produktentstehung durch Zeitraffer-Absorptionsmessungen von *p*-Nitroanilin quantitativ verfolgt werden konnte. Der Effekt der reinen Cosolventien auf diese Enzymreaktion wurde bereits in früheren Studien berichtet.<sup>[130,168]</sup> Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag hauptsächlich auf der Untersuchung, ob die kombinierten Effekte von Druck, Cosolventien und *Crowder*-Substanzen additiv, synergistisch oder antagonistisch und zur Optimierung der Enzymaktivität geeignet sind.

## 9.2 Probenpräparation

Lyophilisiertes Pulver von  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -CT) aus dem Rinderpankreas, TMAO, Harnstoff, Polyethylenglykol (PEG, 4.7 kDa), Dextran (10 kDa) und *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid (SAAPP*p*NA) wurden von Sigma Aldrich erhalten und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Tris-Puffer (100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan + 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 8.0) in Abwesenheit und Gegenwart von Osmolyten und/oder *Crowder*-Substanzen wurden verwendet, um die Enzym- und Substratlösungen für die kinetischen Hochdruck-Stopped-Flow-Untersuchungen herzustellen. Der pH-Wert wurde auf 7.8 eingestellt. Sowohl das Enzym als auch das Substrat wurden in den jeweiligen Pufferlösungen gelöst. Die Anfangskonzentration des Enzyms für alle Messungen vor dem Befüllen in die Probezelle betrug 20 nM (10 nM nach dem Mischen mit der Substratlösung in der Mischkammer). Für das Substrat wurden fünf Konzentrationen zwischen 50  $\mu$ M und 1200  $\mu$ M (25  $\mu$ M und 600  $\mu$ M nach dem Mischen mit der Enzymlösung) gewählt. Mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie (UV-1800, Shimadzu) unter Verwendung der molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon_{280\text{ nm}} = 51000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  für  $\alpha$ -CT;  $\epsilon_{315\text{ nm}} = 14000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  für SAAPP*p*NA<sup>[130]</sup>) konnten die Konzentrationen genau bestimmt werden. Enzymaktivitäten bei verschiedenen Drücken wurden unter Verwendung der HPSF-Apparatur durchgeführt. Details zur Funktionsweise des Messinstruments sind im Kapitel 2.2.2 aufgeführt. Die enzymatische Aktivität des Enzyms wurde durch die Freisetzung des Produkts *p*-Nitroanilin ( $\epsilon_{410\text{ nm}} = 8800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) jeweils 100 Sekunden lang verfolgt. Die Temperatur wurde

für alle Messreihen mittels eines externen Umlaufwasserthermostats bei 25 °C gehalten und der Druck wurde schrittweise in 500 bar-Schritten bis auf 2000 bar erhöht. Bei Erreichen des gewünschten Drucks wurden die Proben 5 Minuten äquilibriert. Diese Parameter wurden ausgewählt, um zuverlässige kinetische Daten in einem geeigneten Zeitfenster der HPSF-Technik zu erhalten und die Daten mit früheren biophysikalischen Studien zu diesem Enzym vergleichen zu können.<sup>[79,109,130]</sup> Analog zu den anderen Projekten wurden mithilfe von Gl. 2-2 und 2-6 die kinetischen Parameter ausgewertet.

### 9.3 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurden FTIR-Messungen durchgeführt, um die strukturelle Stabilität von  $\alpha$ -CT in Gegenwart von 2 M Harnstoff und 1 M TMAO zu überprüfen. Abbildung i-6 zeigt die normierte Amid-I'-Bande von  $\alpha$ -CT sowie die entsprechenden Veränderungen der Sekundärstrukturanteile in Anwesenheit der verschiedenen Cosolventien. Die Position und der Anteil der jeweiligen Subbanden in reinem Puffer stimmen ziemlich gut mit den FTIR-Ergebnissen von MEERSMAN *et al.* überein.<sup>[259]</sup> Die Amid-I'-Bande und der prozentuale Anteil der Sekundärstrukturen in Gegenwart der Cosolventien unterscheiden sich im Vergleich zum reinen Puffer nur geringfügig, was darauf hindeutet, dass auch in 2 M Harnstoff keine Denaturierung auftritt, die sich in der Änderung der Subbande bei  $1645\text{ cm}^{-1}$  zeigen würde. Geringfügige Änderungen der spektralen Bande könnten auf kleine Abweichungen der Bearbeitung (Subtraktion des Hintergrunds) aufgrund der hohen Cosolvskonzentrationen zurückgeführt werden. Bemerkenswert ist, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die in der Kinetikuntersuchungen anwesend sind, eine starke stabilisierende Wirkung auf  $\alpha$ -CT haben.<sup>[263,264]</sup> Minimale Konformationsänderungen, wie sie im Fall von Harnstoff auftreten können, von dem bekannt ist, dass er direkt mit dem Proteinerückgrat und seinen Seitenketten interagiert, können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt wurde die katalytische Aktivität des Enzyms durch Freisetzung des Produkts *p*-Nitroanilin verfolgt, die durch die Erhöhung der optischen Absorption bei 410 nm gemessen wird. Für die Aufzeichnung schneller Reaktionen unter hohem Druck wurde die HPSF-Apparatur verwendet. Abbildung 9-2A-L veranschaulicht die Zeitabhängigkeit der Absorptionsdaten  $A_{410\text{ nm}}(t)$ , die durch MICHAELIS-MENTEN-Diagramme für alle Lösungsbedingungen beschrieben werden kann. Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion,  $v_0$ , steigt mit zunehmender Substratkonzentration an und erreicht bei hohen Substratkonzentrationen in den meisten Fällen einen Plateauwert.

Ferner ist zu erkennen, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten und damit die enzymatische Aktivität für fast alle Lösungsbedingungen infolge hohen Druckes ansteigt. Die Erhöhung der enzymatischen Aktivität bei der druckinduzierten Kompression deutet auf ein negatives Aktivierungsvolumen hin. Eine Ausnahme wird nur für die Messlösungen beobachtet, die PEG und Dextran in Gegenwart aller Cosolventien enthalten, wobei die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit von 1 bar bis 2 kbar weniger ausgeprägt sind. Durch den Vergleich der MICHAELIS-MENTEN-Kurven der reinen Pufferlösung mit denen in Gegenwart von Harnstoff wird eine signifikante Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet, während 10 gew.-% PEG einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Geschwindigkeit der Enzymreaktion zeigt. In Bezug auf das MICHAELIS-MENTEN-Diagramm nach Zugabe von 10 gew.-% Dextran können im Vergleich zum reinen Puffer keine deutlichen Änderungen der Geschwindigkeit der Enzymreaktion beobachtet werden. Wie zu erwarten, zeigen die beiden *Crowder*-Substanzen in Abwesenheit und Gegenwart der Osmolyte einen unterschiedlichen Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

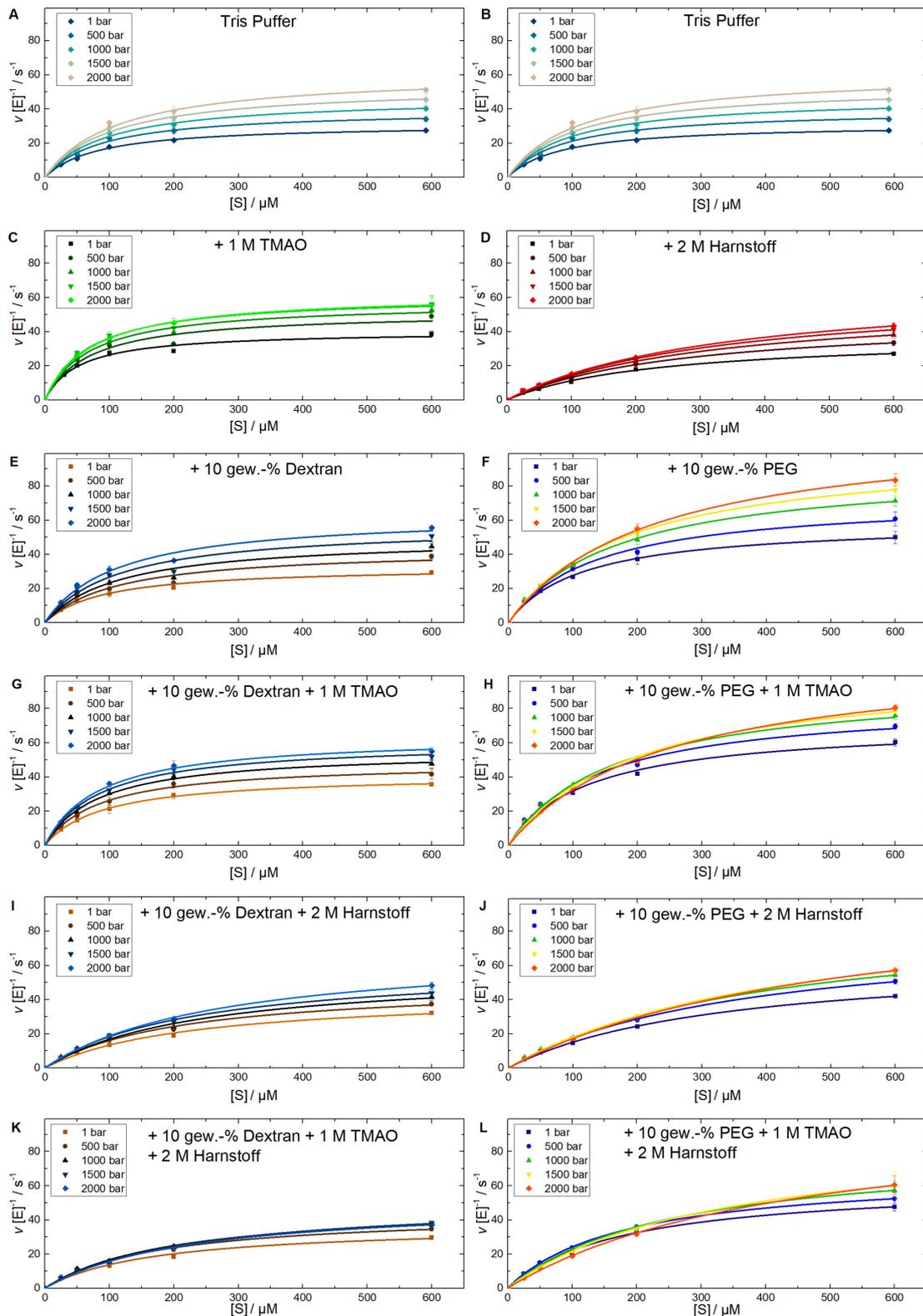


Abbildung 9-2: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme für die Hydrolyse von SAAPPpNA, katalysiert durch  $\alpha$ -CT, bei verschiedenen Substratkonzentrationen  $[S]$  und Drücken  $p$  bei  $T = 25^\circ\text{C}$ . Folgende Messlösungen wurden hierbei untersucht: Tris-Puffer + 1 M TMAO, 2 M Harnstoff, 10 gew.-% Dextran, 10 gew.-% PEG und in verschiedenen Kombinationen.

Um detaillierte Rückschlüsse auf die enzymatische Aktivität in Gegenwart der verschiedenen Additive ziehen zu können, ist es notwendig, den Verlauf über einen MICHAELIS-MENTEN-Fit zu analysieren (Gl. 2-2). Tabelle i-15 fasst alle kinetischen Parameter zusammen, die in Abhängigkeit des Drucks erhalten wurden. In Tabelle i-16 sind die abgeleiteten Aktivierungsvolumina mittels Gl. 2-6 aufgeführt. Abbildung i-7 enthält eine Zusammenfassung der kinetischen Parameter für alle gemessenen Drücke. Zur besseren Übersicht zeigt Abbildung 9-3 die kinetischen Parameter (Abbildung 9-3A-C) in Bezug auf 10 gew.-% Dextran bei einem bar und 2000 bar und das Aktivierungsvolumen (Abbildung 9-3D), während Abbildung 9-4 die ermittelten kinetischen Größen in Bezug auf 10 gew.-% PEG bei 1 bar und 2000 bar und das Aktivierungsvolumen in derselben Reihenfolge hervorhebt.

Mit zunehmendem Druck steigt der  $K_M$ -Wert für alle Lösungsbedingungen an, d. h. die Affinität des Substrats zum Enzym nimmt bei der Kompression ab. Die Abnahme der Affinität ist in reinem Puffer und in Gegenwart von 1 M TMAO weniger ausgeprägt und die Werte liegen in einem ähnlichen Bereich im Vergleich zu den Literaturdaten.<sup>[130,131,176]</sup> 2 M Harnstoff zeigt eine drastische Wirkung auf  $K_M$  im Vergleich zu reinem Puffer, was auf eine deutliche Abnahme der Substratbindungsfähigkeit hinweist, die bei dieser und auch bei anderen Enzymreaktionen beobachtet wurde und auf die Bindung von Harnstoff an das Protein und dessen aktives Zentrum zurückzuführen ist.<sup>[130,280,281]</sup> 10 gew.-% Dextran (Abbildung 9-3A) hat einen geringen bis keinen erkennbaren Einfluss auf  $K_M$ , wohingegen 10 gew.-% PEG und insbesondere 10 gew.-% PEG + 2 M Harnstoff (Abbildung 9-4A) ebenfalls eine negative Wirkung auf  $K_M$  haben.

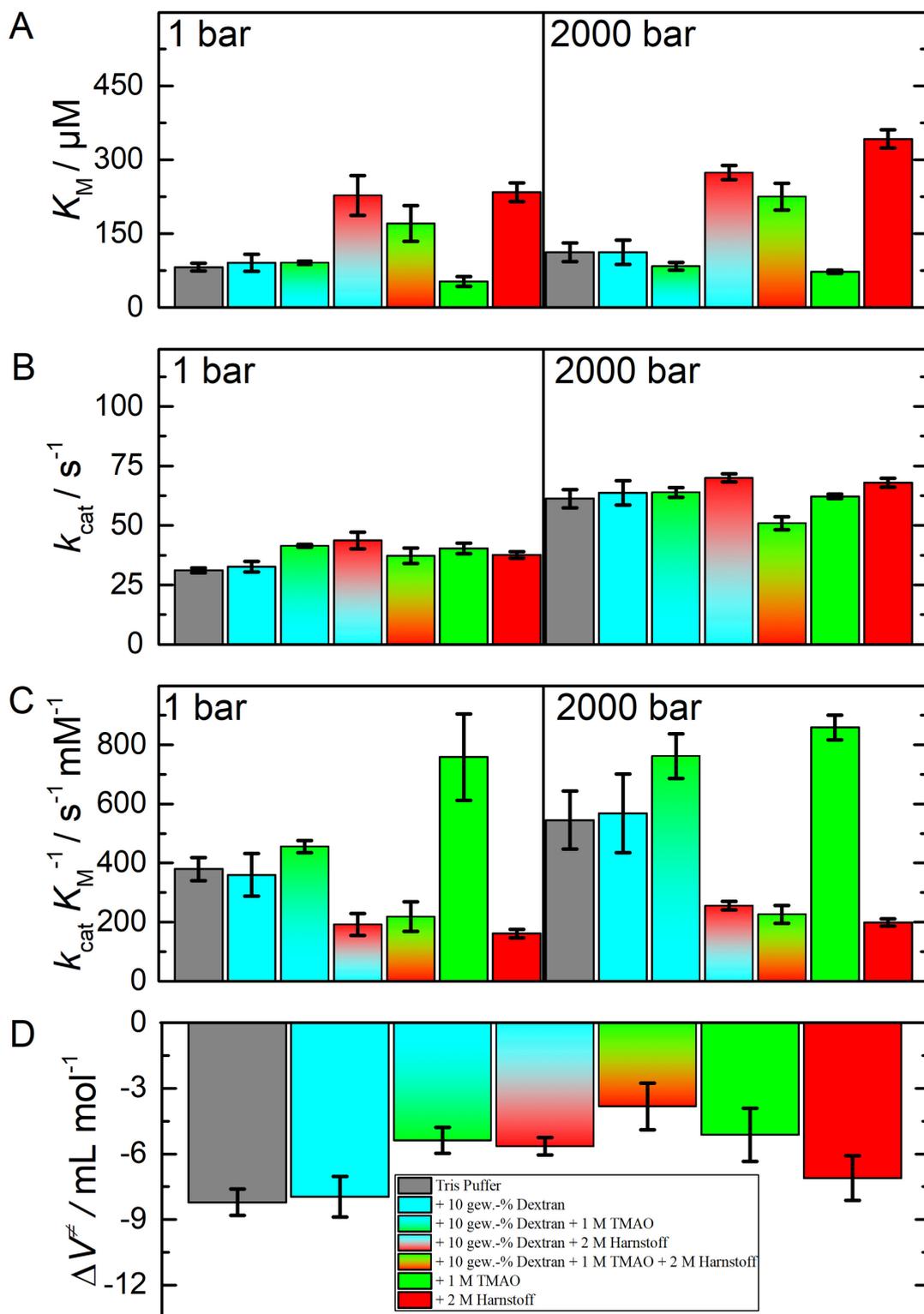


Abbildung 9-3: Druckabhängigkeit der kinetischen Größen für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SAAPPpNA in verschiedenen Messlösungen bezüglich 10 gew.-% Dextran: A) MICHAELIS-Konstante, B) Wechselzahl, C) katalytische Effizienz und D) Aktivierungsvolumen.

Bemerkenswerterweise steigt die Wechselzahl bei der Kompression in allen Lösungen um den Faktor 1.5 bis 2 an (Abbildung 9-3B, Abbildung 9-4B), wobei die größten Werte für Lösungen mit 10 gew.-% PEG beobachtet wurden. Die Zugabe von 10 gew.-% Dextran hat keinen signifikanten Einfluss auf  $k_{\text{cat}}$  in Bezug auf die reine Pufferlösung. Wie in den Abbildungen 9-3C und 9-4C gezeigt, ist die katalytische Effizienz  $k_{\text{eff}}$  in Anwesenheit von 1 M TMAO bei Atmosphärendruck sowie bei 2 kbar am größten. Die katalytische Effizienz ist in Gegenwart von 10 gew.-% Dextran oder 10 gew.-% PEG für alle Drücke relativ ähnlich, nimmt aber für die anderen Lösungsmittelgemische auch bei Kompression ab. Die Zugabe des Tiefsee-Osmolyts TMAO zeigt bei weitem die positivste Wirkung auf die katalytische Effizienz, während die Zugabe von Harnstoff zum umgekehrten Effekt führt, und PEG und Dextran als zwei repräsentative *Crowder* unterschiedlicher Natur zeigen nahezu ähnliche Werte für  $k_{\text{eff}}$  im Vergleich zu reinem Puffer. Ein synergistischer, aber negativer Effekt von *Crowdern* und Cosolventien konnte nur für die MICHAELIS-Konstante in Gegenwart von 10 gew.-% PEG und 2 M Harnstoff beobachtet werden, während 10 gew.-% Dextran einen solchen zusätzlichen Effekt nicht zeigt. Die kinetischen Parameter  $k_{\text{eff}}$  und  $k_{\text{cat}}$  werden nur von einer der Komponenten, PEG und TMAO, signifikant beeinflusst.

Wie erwartet, zeigt  $\alpha$ -CT für alle Lösungsbedingungen (Abbildung 9-3D, Abbildung 9-4D) ein negatives Aktivierungsvolumen, d. h. das Volumen des Übergangszustands ( $\text{ES}^\ddagger$ ) ist kleiner als das Volumen des ES-Komplexes (ES), was auf die Füllung eines bestimmten Hohlraumvolumens, Hydratationsänderungen oder kleinere Konformationsänderungen innerhalb der aktiven Tasche des Enzyms im Verlauf der Reaktion zurückgeführt werden kann.<sup>[94,140,176]</sup> Die Volumendifferenz liegt im Bereich von  $-4$  bis  $8 \text{ mL mol}^{-1}$  und damit etwa ein Zehntel kleiner als die Volumenänderung bei der Entfaltung eines Proteins.<sup>[100]</sup> Dies ist ein eindrucksvoller Beweis für die Leistungsfähigkeit der Methode für die Bestimmung kleinster Volumenänderungen. Solche  $\Delta V^\ddagger$ -Werte von  $\alpha$ -CT-katalysierten Hydrolysereaktionen stimmen gut mit den Literaturergebnissen für dieses und andere Substrate in reiner Pufferlösung überein.<sup>[109,130,168]</sup> Die ähnlichen  $\Delta V^\ddagger$ -Werte implizieren keine oder nur minimale Veränderungen der Struktur des Übergangskomplexes durch die verschiedenen wässrigen Lösungsumgebungen.

Die geringere Affinität, d. h. der höhere  $K_M$ -Wert, bei Zugabe von 10 gew.-% PEG kann durch einen erhöhten Diffusionswiderstand innerhalb der Probe,<sup>[308]</sup> oder wahrscheinlicher durch Wechselwirkungen des weitgehend hydrophoben PEG mit dem hydrophoben Substrat und den

hydrophoben Domänen des Proteins verursacht werden.<sup>[31,94,256]</sup> Dies führt zu stark vom idealen Verhalten abweichenden Aktivitätskoeffizienten.<sup>[290,309]</sup> Überraschenderweise steigt  $k_{\text{cat}}$  in allen Lösungen in Anwesenheit von PEG an, was für diesen *Crowder* recht ungewöhnlich ist.<sup>[298]</sup> Dafür können unterschiedliche Aktivitätskoeffizienten der freigesetzten Produkte und eine Änderung der Wasseraktivität in Gegenwart von PEG ursächlich sein. Umgekehrt zeigt der hydrophilere *Crowder* Dextran keinen signifikanten Einfluss auf die kinetischen Parameter. Die Literaturdaten zu den Einflüssen auf  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  sind vielseitig, da sich die Parameter in Abhängigkeit der Größe und Konzentration des *Crowders*, aber auch von der Größe des Enzyms selbst, in beide Richtungen ändern können.<sup>[289,301,308]</sup> Das hier verwendete Dextran mit einer geringen Größe von 10 kDa in 10 gew.-%iger Konzentration hatte keinen nennenswerten Einfluss auf diese Enzymreaktion. Hinsichtlich der katalytischen Effizienz zeigt Harnstoff den größten nachteiligen Effekt auf  $K_M$ . Die Erhöhung von  $K_M$  kann verschiedene Gründe haben. Harnstoff kann sowohl als kompetitiver Inhibitor des Substrats wirken oder mit dem Substratmolekül oder bevorzugt mit der Proteinoberfläche interagieren. Der Anstieg des kinetischen Parameters  $k_{\text{cat}}$  könnte durch günstige Veränderungen in der Konformationsdynamik des aktiven Zentrums des Enzyms erklärt werden. Ein ähnliches Verhalten wurde bei anderen enzymatischen Reaktionen beobachtet.<sup>[310,311]</sup>

Auf der anderen Seite zeigt TMAO im Vergleich zu allen anderen Lösungen die höchste katalytische Effizienz. Im Allgemeinen besitzt TMAO die Fähigkeit, bevorzugt mit dem *bulk* Wasser zu interagieren, was zu einer Zunahme der Wasserstoffbrückenbindungen und der Strukturierung des Lösungsmittels führt. TMAO wird bevorzugt von der Proteingrenzfläche ausgeschlossen, wodurch seine Hydratation erhöht wird.<sup>[94,114,193]</sup>

9.3 Ergebnisse und Diskussion

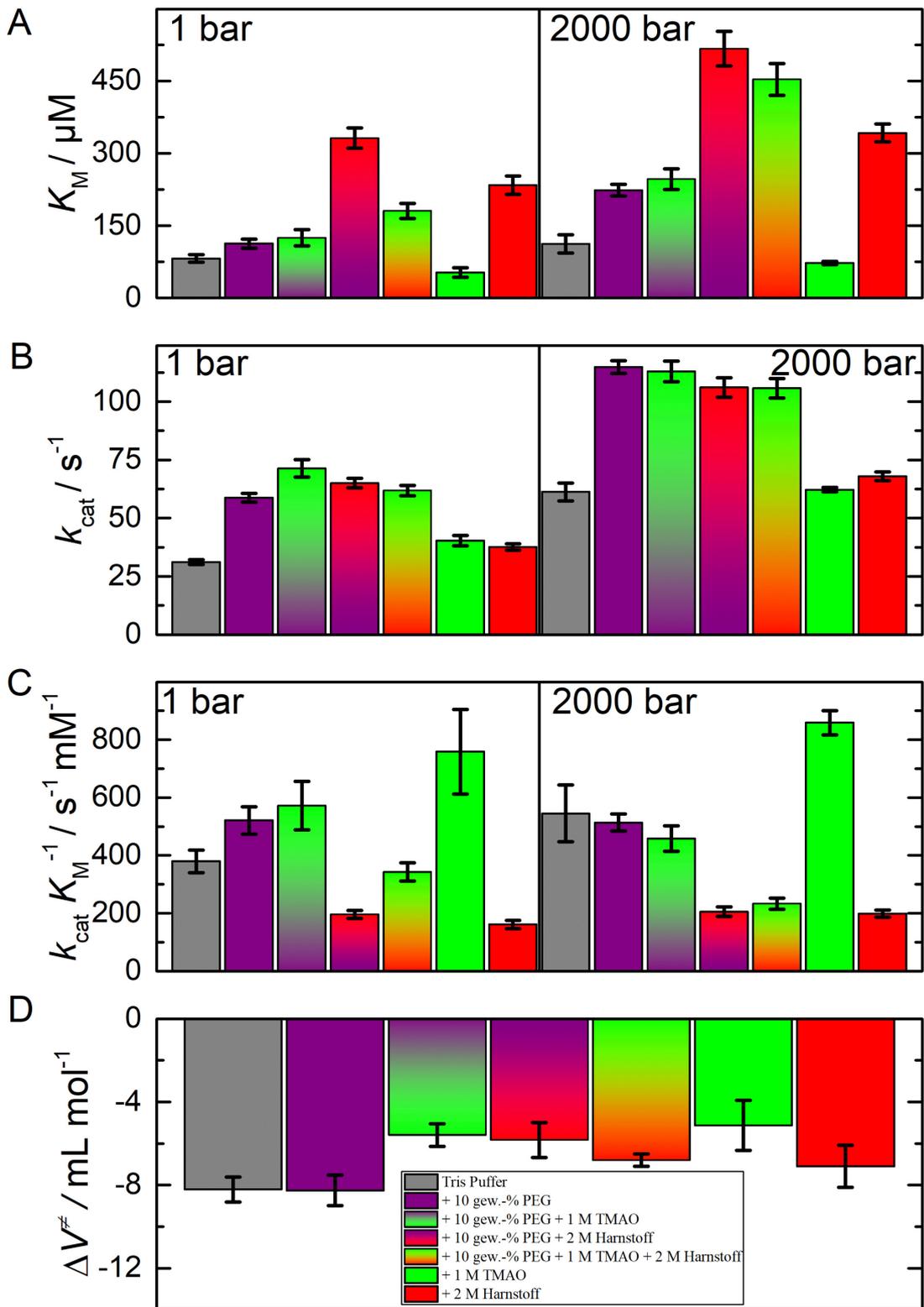


Abbildung 9-4: Druckabhängigkeit der kinetischen Größen für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SAAPPpNA in verschiedenen Messlösungen bezüglich 10 gew.-% PEG: A) MICHAELIS-Konstante, B) Wechselzahl, C) katalytische Effizienz und D) Aktivierungsvolumen.

## 9.4 Zusammenfassung

Die chemische und pharmazeutische Industrie ist auf Maßnahmen zum Schutz von Enzymen vor Belastungen angewiesen, die mit ihrer Herstellung, ihrem Transport, ihrer Lagerung und Verwendung einhergehen. Zu diesem Zweck muss der gesamte Parameterraum der thermodynamischen Variablen erforscht werden, die neben den häufig untersuchten Variablen (Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert) auch Cosolvskonzentrationen, *Crowder*-Effekte und Druck miteinschließen. Erkenntnisse aus der Natur können hierbei hilfreich sein. Das komplexe zelluläre Milieu ist verantwortlich für die sogenannte quaternäre Struktur (und Strukturdynamik) der Proteine in der biologischen Zelle, die die fünfte Ebene ihrer Organisation darstellt. Die Quaternärstruktur besteht aus allen schwächeren und transienten Wechselwirkungen zwischen dem Protein und seiner Umgebung, die auch durch Umweltbelastungen, wie z. B. niedrigem/hohem pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und Druck, stark moduliert werden. Mithilfe bestimmter Cosolute ist es Extremophilen, z. B. Piezophilen, die in der Tiefsee unter Hochdruckbedingungen leben, gelungen, ihre Enzyme zu stabilisieren und ihre Aktivität zu verbessern, was nicht nur für das Verständnis des Lebens in extremen ökologischen Umgebungen wichtig ist, sondern auch für die Optimierung enzymbasierter industrieller Prozesse nützlich sein kann. Im Allgemeinen beeinflussen *Crowder*-Substanzen Proteine über eine Kombination aus entropischen (*excluded void volume*) und enthalpischen Effekten (schwache unspezifische Wechselwirkungen mit Enzym und Substrat).<sup>[29,312]</sup> Es kann angenommen werden, dass sich die enthalpischen Effekte, die z. B. durch Dextran und PEG hervorgerufen werden, aufgrund ihrer unterschiedlichen funktionellen Gruppen unterscheiden, während die entropischen Effekte aufgrund ihrer ähnlichen Größe, die hier verwendet wurde (hydrodynamischer Radius  $\sim 2.3\text{-}2.4\text{ nm}^{[313-315]}$ ), in geringerem Maße variieren können, obwohl sie unterschiedliche Formen besitzen. Dextran-basierte *Crowder* sind verzweigte Polymere aus Saccharose und verhalten sich im Vergleich zu den stabförmigen Partikeln des linearen Kettenpolymers PEG eher wie globuläre Zufallsknäuel. Daher ist, anders als beim hydrophilen Dextran, ein negativer Effekt auf die MICHAELIS-Konstante zu erwarten, wie experimentell auch beobachtet wurde.

Es konnte beobachtet werden, dass *Crowder*-Moleküle und Cosolventien sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die enzymatische Reaktion haben, die schwer vorherzusagen sind, insbesondere, wenn sie im Zusammenspiel mit Druckveränderungen angewendet werden. Die katalytische Effizienz der Hydrolysereaktion von  $\alpha$ -CT ist in Anwesenheit von 1 M TMAO am größten

und verstärkt sich bei höheren Drücken noch weiter. Darüber hinaus ist  $k_{\text{eff}}$  für die reine Pufferlösung, reines 10 gew.-% PEG und reines 10 gew.-% Dextran relativ ähnlich, nimmt jedoch für die Cosolvent-Crowder-Mischungen größtenteils bei 1 bar sowie bei der Kompression ab. Daher zeigt die Zugabe des Tiefsee-Osmolyts TMAO den bei weitem positivsten Effekt auf die katalytische Effizienz, während die Zugabe des chaotropen Stoffs Harnstoff zum umgekehrten Effekt führt und PEG und Dextran als zwei repräsentative Crowder-Substanzen unterschiedlicher Natur nahezu ähnliche Werte für  $k_{\text{eff}}$  im Vergleich zu den reinen Pufferdaten aufweisen. TMAO ist ein kleiner Cosolut, der sowohl stark hydrophile als auch hydrophobe Solvatisierungsbereiche bietet und ein großes Dipolmoment besitzt ( $\sim 5$  D). Aufgrund seiner starken H-Bindungskapazität führt TMAO zu signifikanten strukturellen Veränderungen des Lösungsmittels (Wasser) und zu einem sehr wirksamen thermodynamisch begünstigten Ausschluss von Proteinoberflächen. Das heißt, es zeigt einen stark solvophoben Effekt, der die Proteinhydratation verstärkt, die intermolekularen Abstände beeinflusst und intermolekulare attraktive Wechselwirkungen verstärken kann.<sup>[114,193]</sup>

Um die kinetischen Grundlagen der beobachteten Änderungen der verschiedenen kinetischen Größen zu identifizieren und die Auswirkungen der verschiedenen Parameter im Zusammenspiel quantitativ vorherzusagen, kann die Kenntnis der thermodynamischen Aktivität der Reaktanden solcher Mehrkomponentenlösungen, wie sie hier verwendet wurden, nützlich sein. Hierfür werden die Aktivitätskoeffizienten aller Reaktandenspezies der enzymatischen Reaktion für die verschiedenen Lösungsbedingungen benötigt, was eine gewaltige Aufgabe ist. Prinzipiell können solche Informationen aus experimentellen und theoretischen Untersuchungen über die *Perturbed-Chain Statistical Associating fluid theory* (PC-SAFT) gewonnen werden, wie bereits für einige ausgewählte Systeme gezeigt wurde.<sup>[256,309]</sup> Solche Informationen wären auch zur Optimierung enzymatischer Reaktionen in technologischen Anwendungen, wie z. B. im Bereich der Biotechnologie, der Pharmaindustrie und dem *Protein engineering*, zwingend erforderlich. Als zukünftiges Ziel können solche Konzepte dann auch auf noch komplexere Systeme angewendet werden, einschließlich enzymatischer Reaktionen in Mikrokompartimenten, wie zum Beispiel in wässrigen Zweiphasensystemen, die als *in vitro* Modellsysteme für fluide, membranlose Organellen dienen, wobei die höheren lokalen Konzentrationen von lokalisiertem Enzym und Substrat und die damit einhergehende Erhöhung der Geschwindigkeit ausgenutzt werden können.<sup>[316,317]</sup>

## 10. Fazit und Ausblick

Hoher Druck ist ein wichtiges Merkmal bestimmter natürlicher Umgebungen wie der Tiefsee, in der Drücke bis zu etwa 1 kbar herrschen. Darüber hinaus ist die Untersuchung von Druckeffekten auf Biosysteme von zunehmendem Interesse für biotechnologische Anwendungen, wie zum Beispiel die Piezoenzymologie. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von zwei verschiedenen natürlichen Osmolytmischungen, deren Hauptbestandteile Glycin und Trimethylamin-*N*-oxid waren, auf die Aktivität von  $\alpha$ -Chymotrypsin mittels Hochdruck-Stopped-Flow-Messungen untersucht. Außerdem wurde in einer Studie durch die Mehrkomponenten-Natur des dichtgepackten, cytosolischen Milieus von Piezophilen inspirierten Studie, die kombinierte Wirkung von makromolekularen *Crowdern*, Cosolventien und Druck auf die Hydrolysereaktion von  $\alpha$ -CT eingehend untersucht. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass Druck nicht nur in der Lage ist, die katalytische Aktivität und Effizienz des Enzyms drastisch zu erhöhen, sondern dass Glycin im Vergleich zu TMAO eine signifikante Wirkung auf die enzymatische Aktivität und die volumetrischen Eigenschaften der Hydrolyse von  $\alpha$ -CT hat. Bezüglich der Katalyse von SAAPPpNA können *Crowder*-Substanzen und Cosolventien hingegen sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität haben. Die Zugabe des Tiefsee-Osmolyts Trimethylamin-*N*-oxid zeigt hierbei die bei weitem die positivste Wirkung auf die katalytische Effizienz, welche bei höheren Drücken sogar deutlich verstärkt wird. Die Zugabe von Harnstoff führt zum gegenteiligen Effekt, und PEG und Dextran, als zwei repräsentative *Crowder*-Substanzen unterschiedlicher Natur, zeigen für  $k_{\text{eff}}$  im Vergleich zu den reinen Pufferdaten nahezu ähnliche Werte. Diese Ergebnisse können nicht nur helfen, die Modulation enzymatischer Reaktionen durch natürliche Osmolyte zu verstehen, sondern auch für das Verständnis von Lebensprozessen in extremen Umgebungen relevant sein, bei denen die extrinsischen und intrinsischen Anpassungen von Tiefseeorganismen im Fokus liegen. Folglich sollten bei weiteren Studien das gewählte Enzym variiert und die Temperatur an Tiefseeverhältnisse angepasst werden. Derartige Informationen können auch für den Einsatz und die Optimierung von Enzymen in der industriellen Verarbeitung verwendet werden, die oft ebenfalls harsche Bedingungen erfordern.

In dieser Arbeit wurde auch das industrierelevante Enzym Formiatdehydrogenase untersucht, welches hauptsächlich für die Rückgewinnung des Kofaktors NADH eingesetzt wird. Der hohe Verbrauch dieses Kofaktors ist einer der Kostentreiber für den Einsatz anderer industriell relevanter Enzymsysteme. Allerdings weist FDH einige erhebliche Limitierungen in der kommer-

ziellen Anwendung auf. Deshalb wurde mittels experimenteller und theoretischer Untersuchungen in Abhängigkeit der Temperatur, des Drucks und chemischer Additive die Optimierung der operativen Stabilität und Enzymaktivität angestrebt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Temperatur sowie Druck die katalytische Effizienz des Enzyms um ein Vielfaches erhöhen. Darüber hinaus erwies sich TMAO als effizientestes Cosolut, welches in der Lage war die Enzymaktivität nochmals zu verbessern. Mithilfe der PC-SAFT-Modellierung konnte für die FDH-katalysierte Reaktion aus den aktivitätsbasierten kinetischen Parametern der Einfluss der Cosolute auf die MICHAELIS-Konstante vorausberechnet werden, welche im Einklang mit den experimentellen Ergebnissen stehen. Die erhaltenen Ergebnisse liefern weitere wichtige Erkenntnisse, um Cosolut-Effekte auf enzymkatalysierte Reaktionen zu interpretieren sowie zu quantifizieren, die in biologischen Lösungen und in vielen technologischen Anwendungen ablaufen. Zusammenfassend deuten all diese Ergebnisse darauf hin, dass die katalytische Effizienz mittels Druck, Temperatur, Cosolventien sowie makromolekularen *Crowdern* in den meisten Fällen noch optimiert werden kann. Um dies jedoch im industriellen Ausmaß zu realisieren, müssen zunächst in jedem einzelnen Fall für jede Enzymreaktion eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt werden, bei der im Multiparameterraum das System optimiert wird. Erweisen sich die Ergebnisse als ökonomisch rentabel, sollte für die Herstellung des Produktes, z. B. unter Anwendung von hohen Drücken, eine Umrüstung der technologischen Anlagen erfolgen. Unter bestimmten Bedingungen können Peptide in der Größenordnung von 5 bis 10 Aminosäuren durch die Bildung von Amyloidfibrillen (AF) wohldefinierte Konformationen aufweisen, die mit vielen verschiedenen Erkrankungen des Menschen (z. B. Parkinson und Alzheimer) assoziiert werden. Hinsichtlich der modernen Nanotechnologie entstand aufgrund der besonderen Eigenschaften (hohe Stabilität, fein geordnete Nanostruktur, biologisch abbaubare proteinartige Aggregate) ein beträchtliches Interesse an der Erforschung dieser selbstassemblierenden Polypeptide. In den letzten Jahren konnte obendrein festgestellt werden, dass die Amyloidfibrillen auch katalytisch aktiv sein können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde einerseits der Einfluss des Drucks auf die Stabilität mittels FTIR-Spektroskopie und andererseits die Auswirkungen von Druck und Cosolventien auf die katalytische Aktivität eines *de novo* entworfenen AFs (Ac-IHIHIQI-CONH<sub>2</sub>) durch Hochdruck-Stopped-Flow-Messungen untersucht. FTIR-spektroskopische Daten zeigten eine bemerkenswerte Druck- und Temperaturstabilität des fibrillären Katalysators. In Hinblick auf die Enzymaktivität konnte eine Beschleunigung der Enzymaktivität bei Temperatur- und Druckerhöhung beobachtet werden, die durch das Cosolvens TMAO sowie den makromolekularen *Crowder* Ficoll noch weiter verstärkt wurde. Diese Erkenntnisse

deuten darauf hin, dass selbstassemblierende Peptide in den Anfangsstadien der Entstehung des Lebens eine entscheidende Rolle gespielt haben, da unter den vorherrschenden harschen Bedingungen die Enzymaktivität weiterhin gewährleistet ist. Potenziell könnten Amyloidfibrillen auch für industrielle Prozesse genutzt werden, da diese einige Vorteile gegenüber globulären Proteinen bieten. Die Schwierigkeit würde eher darin bestehen, kurzkettige Peptide zu synthetisieren, die den katalytischen Charakteristika eines evolutionär optimierten globulären Enzyms entsprechen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des Drucks, der Temperatur sowie einiger Cosolventien auf die Proteinstabilität erforscht. Chaperonin-Systeme (Hitze- und Kälteschockproteine) treten in allen Lebensbereichen auf und schützen Proteine unter inneren und äußeren Stressbedingungen vor Fehlfaltung. Hier wurde die Thermo- und Piezostabilität von GroEL, GroES und dem GroEL-GroES-Komplex in Gegenwart von Cosolventien, Nukleotiden und Salzen mithilfe der quantitativen FTIR-Spektroskopie und der Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Aufgrund der hohen biologischen Relevanz und mangelnder Literaturdaten wurde der Fokus insbesondere auf den Druckeinfluss auf das Chaperonin-System gelegt. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass der GroEL-GroES-Komplex mit  $T_u = 70$  °C bemerkenswert temperaturstabil ist und die Entfaltungstemperatur durch kompatible Cosolventien wie TMAO noch leicht erhöht werden kann. Umgekehrt verhält es sich mit der Druckstabilität von GroEL und damit auch des GroEL-GroES-Komplexes, welche wesentlich geringer als die von monomeren Proteinen ist. Während GroES bis zu ~5 kbar druckstabil ist, weisen GroEL und der GroEL-GroES-Komplex bereits jenseits von 1 kbar geringfügige Strukturveränderungen auf, die auf einen dissoziationsbedingten Konformationsdrift zurückzuführen sind. Erstaunlicherweise wurde bis zu einem Druck von 10 kbar keine signifikante Entfaltung von GroEL beobachtet, d. h. die Untereinheiten selbst sind sehr druckstabil. Was die physiologische Relevanz betrifft, so bleibt die strukturelle Integrität des Chaperoninsystems in einem relativ engen Druckbereich von etwa 1 bar bis 1 kbar erhalten, was genau dem Druckbereich entspricht, dem das Leben auf der Erde begegnet.

Hinsichtlich der Proteinstabilität von extremophilen Organismen wurde das Arginin-Bindungsprotein (ArgBP) von *Thermotoga maritima* und seiner gefalteten Fragmente in Abhängigkeit des Drucks erforscht. Das ArgBP wies eine bemerkenswerte Druckstabilität auf, da nur geringfügige strukturelle Änderungen bis einschließlich 10 kbar zu beobachten waren. Wie aus einer durchgeführten Literaturrecherche erkennbar ist, wurden bisher keinerlei Proteine aus extremophilen Organismen

philen Organismen hinsichtlich der Druckstabilität untersucht. Weiterhin kann aus der Literaturrecherche entnommen werden, dass ArgBP eine höhere Temperatur- und Druckstabilität im Vergleich zu Proteinen aus mesophilen Organismen aufweist. Anhand der Literaturdaten und den hier gezeigten Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass die meisten untersuchten Proteine bis mindestens 1 kbar druckstabil sind. Im niedrigen kbar-Bereich ist hauptsächlich bei oligomeren Proteinen eine druckinduzierte Dissoziation zu beobachten, wohingegen der Entfaltungsprozess monomerer Proteine eher bei Drücken jenseits 4 kbar stattfindet. Die Zunahme der Stabilität gegenüber der thermischen Entfaltung oder der Lebensdauer durch Anwendung von höheren Drücken, wie schon bei einigen Proteinen festgestellt wurde, kann sich für die industrielle Praxis als nützlich erweisen.

Ein weiteres Projekt beinhaltete die Erforschung der Enzymaktivität und der Stabilität eines gut untersuchten Enzymmodells in Hinblick auf mögliche extraterrestrische Lebensräume, die auf Basis einiger Indizien und hypothetischen Annahmen beruhen und in der aktuellen Forschung der Astrobiologie von großen Interesse sind. Tiefe unterirdische Umgebungen können z. B. Wasser und hohe Konzentrationen gelöster Salze enthalten, doch das Wissen, wie dies die Lebensbedingungen beschränkt, ist begrenzt. Noch weniger ist darüber bekannt, wie Effekte hohen Drucks die Lebensmöglichkeiten einschränken. Einiger dieser Salze, welche in extremen Umgebungen auf der Erde und weit verbreitet auf dem Mars gefunden wurde, enthalten Perchlorat. Bezüglich unseres Nachbarplaneten wurde die Hypothese aufgestellt, dass im tiefen Untergrund des Mars konzentrierte Perchloratlösungen existieren. Dadurch ergibt sich die Frage, wie diese aggressiven Salze in Kombination mit dem hohen Druck die Habitabilität eines solchen planetarischen Körpers beeinflussen würden. In diesem Zusammenhang wurde die Wechselwirkung von hohem Druck und hohen Perchlorat-Ionenkonzentrationen auf die Aktivität von  $\alpha$ -CT untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Drücke die  $\alpha$ -Chymotrypsin-Enzymaktivität selbst bei hohen Perchloratkonzentrationen fördern, sowie dass Perchloratsalze den nativen  $\alpha$ -Chymotrypsin-Phasenraum zu niedrigeren Temperaturen und Drücken verschieben. Daher können tiefe unterirdische Umgebungen, einschließlich des Marsuntergrunds, die diese Belastungen kombinieren, möglicherweise lebensfreundlicher sein als bisher angenommen. Welche weiteren äußeren Einflüsse in diesen extraterrestrischen Umgebungen vorherrschen und inwieweit diese für das Leben relevant sein können, ist heutzutage noch weitgehend rein hypothetischer Natur. Jedoch können anhand solcher Studien Einblicke hinsichtlich der physikalischen und chemischen Grenzen des Lebens herausgefunden werden, um die Habitabilität anderer planetarischer Körper als Orte möglicher Lebensformen bewerten zu können.

## i. Anhang

### i.1 Übersicht der Chemikalien

*Tabelle i-1:* Verwendete Chemikalien und Protein sowie deren Bezugsquellen.

Chemikalien/ Proteine	CAS-Register- nummer	Bezugsquelle
Acetonitril (wasserfrei)	75-05-8	VWR (Radnor USA)
Adenosindiphosphat (ADP)	58-64-0	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Adenosintriphosphat (ATP)	56-65-5	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
$\alpha$ -Chymotrypsin (Rinderpankreas)	9004-07-3	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
BaSO <sub>4</sub>	7727-43-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Betain	107-43-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
CaCl <sub>2</sub>	10043-52-4	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Deuteriumoxid (D <sub>2</sub> O)	7789-20-0	VWR (Radnor, USA)
Dextran (10 kDa)	9004-54-0	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Dithiothreitol (DTT)	6892-68-8	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Ficoll ® PM70	72146-89-5	GE Healthcare Life Science (Uppsala, Schweden)
Formiatdehydrogenase ( <i>Candida boidinii</i> )	9028-85-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Glycin	56-40-6	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Harnstoff	57-13-6	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
<sup>13</sup> C-Harnstoff	58069-82-2	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
KCl	7447-40-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
MgCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	7786-30-3	Merck KGaA (Darmstadt)
Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	10034-81-8	Alfa Aeser (Ward Hill, USA)
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10034-99-8	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdeuteroxid (NaOD)	14014-06-3	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Natriumformiat	141-53-7	Carl Roth (Karlsruhe)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7558-80-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7558-79-4	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

Nicotinamidadenindinukleotid oxidierte Form, (NAD <sup>+</sup> )	53-84-9	Carl Roth (Karlsruhe)
Nicotinamidadenindinukleotid reduzierte Form, (NADH), Dinatriumsalz	606-68-8	Carl Roth (Karlsruhe)
PEG (4.6 kDa)	25322-68-3	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
<i>p</i> -Nitrophenol	100-02-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
<i>p</i> -Nitrophenylacetat	830-03-5	Alfa Aeser (Ward Hill, USA)
Prolin	147-85-3	Fluka (St. Gallen, Schweiz)
Sarkosin	107-97-1	Acros Organics (Geel, Belgien)
<i>N</i> -Succinyl-L-Phenylalanin- <i>p</i> -Nitroanilid	2440-62-2	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
<i>N</i> -Succinyl-L-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -Nitroanilid	70967-97-4	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Trimethylamin- <i>N</i> -oxid	1184-78-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Trimethylamin- <i>N</i> -oxid · 2 H <sub>2</sub> O	62637-93-8	Alfa Aeser (Ward Hill, USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	77-86-1	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Valin	72-18-4	Fluka (St. Gallen, Schweiz)
ZnCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	7646-85-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

## i.2 Übersicht der Geräte und Materialien

*Tabelle i-2:* Verwendete Geräte und Materialien sowie deren Bezugsquellen.

Geräte/ Materialien	Bezeichnung	Bezugsquelle
Biophotometer plus	BioPhotometer plus	Eppendorf AG (Hamburg)
CaF <sub>2</sub> -IR-Fenster	Round Crystal Window	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Diamantfenster	Type Iia Window-Plate	Almax easyLab (Cambridge, USA)
Diamantstempelzelle	Diacell ® VivoDac	Almax easyLab (Cambridge, USA)
Druckregler	PACE 5000	General Electric (Fairfield)
Fluoreszenzspektroskopie	K2	ISS (Champaign, IL, USA).
Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	Nicolet 5700	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	Nicolet Magna-IR 550	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefriertrockner	Alpha 1-2 LDplus	Christ (Osterode am Harz, Deutschland)
Hochdruck-Stopped-Flow-Apparatur	HPSF-56	TgK Scientific (Bradford-on-Avon)
UV/Vis-/Photometer	BioPhotometer plus	Eppendorf AG (Hamburg)
UV/Vis-/Spektrophotometer	UV-1800	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Vakuumentgaser	ThermoVac	Microcal. Inc. (Northampton, USA)
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG (Hamburg)

i.3 Daten aus dem Projekt: Einfluss von Glycin, TMAO und Osmolytgemischen auf die druckabhängige katalytische Aktivität von  $\alpha$ -Chymotrypsin

*Tabelle i-3:* Berechnete kinetische Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), maximale Geschwindigkeit ( $v_{max}$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ )) der  $\alpha$ -CT-Reaktion für alle Drücke und Osmolytgemische ( $T = 20$  °C).

	$p /$ bar	$K_M /$ $10^{-3} \text{ M}$	$v_{max} /$ $10^{-8} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$	$k_{cat} /$ $10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{cat} K_M^{-1} /$ $\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$
Tris-Puffer	1	$0.287 \pm 0.055$	$1.82 \pm 0.14$	$2.28 \pm 0.18$	$7.94 \pm 1.66$
	500	$0.223 \pm 0.075$	$2.38 \pm 0.22$	$2.98 \pm 0.28$	$13.39 \pm 4.68$
	1000	$0.244 \pm 0.061$	$3.22 \pm 0.26$	$4.02 \pm 0.32$	$16.47 \pm 4.33$
	1500	$0.212 \pm 0.064$	$4.53 \pm 0.41$	$5.66 \pm 0.51$	$26.69 \pm 8.41$
	2000	$0.135 \pm 0.033$	$5.75 \pm 0.39$	$7.19 \pm 0.49$	$53.15 \pm 13.48$
<i>Shallow shrimp</i> -Gemisch	1	$0.389 \pm 0.075$	$3.43 \pm 0.20$	$4.29 \pm 0.25$	$11.04 \pm 2.23$
	500	$0.353 \pm 0.112$	$4.06 \pm 0.34$	$5.08 \pm 0.43$	$14.40 \pm 4.75$
	1000	$0.250 \pm 0.068$	$4.67 \pm 0.31$	$5.84 \pm 0.39$	$23.36 \pm 6.52$
	1500	$0.258 \pm 0.058$	$6.09 \pm 0.33$	$7.61 \pm 0.42$	$29.51 \pm 6.77$
	2000	$0.229 \pm 0.056$	$7.78 \pm 0.46$	$9.73 \pm 0.57$	$42.53 \pm 10.75$
<i>Deep sea</i> -Gemisch	1	$0.387 \pm 0.040$	$2.26 \pm 0.06$	$2.82 \pm 0.11$	$7.28 \pm 0.78$
	500	$0.248 \pm 0.029$	$2.70 \pm 0.08$	$3.38 \pm 0.11$	$13.62 \pm 1.69$
	1000	$0.237 \pm 0.044$	$3.55 \pm 0.16$	$4.44 \pm 0.21$	$18.72 \pm 3.60$
	1500	$0.271 \pm 0.085$	$5.09 \pm 0.40$	$6.36 \pm 0.40$	$23.49 \pm 7.60$
	2000	$0.266 \pm 0.077$	$7.04 \pm 0.50$	$8.8 \pm 0.64$	$33.10 \pm 9.82$
Tris-Puffer + 1 M Glycin	1	$0.258 \pm 0.079$	$3.27 \pm 0.26$	$4.09 \pm 0.32$	$15.85 \pm 2.51$
	500	$0.239 \pm 0.084$	$3.88 \pm 0.34$	$4.85 \pm 0.42$	$20.29 \pm 3.66$
	1000	$0.181 \pm 0.074$	$5.18 \pm 0.49$	$6.48 \pm 0.61$	$35.79 \pm 7.49$
	1500	$0.205 \pm 0.048$	$7.17 \pm 0.40$	$8.96 \pm 0.50$	$43.75 \pm 10.47$
	2000	$0.199 \pm 0.050$	$9.30 \pm 0.56$	$11.62 \pm 0.70$	$58.46 \pm 16.17$
Tris-Puffer + 1 M TMAO	1	$0.392 \pm 0.105$	$2.28 \pm 0.33$	$2.85 \pm 0.42$	$7.26 \pm 2.77$
	500	$0.287 \pm 0.071$	$2.78 \pm 0.35$	$3.48 \pm 0.44$	$12.12 \pm 6.33$
	1000	$0.245 \pm 0.048$	$3.71 \pm 0.35$	$4.64 \pm 0.44$	$18.91 \pm 4.16$
	1500	$0.274 \pm 0.066$	$5.05 \pm 0.60$	$6.31 \pm 0.76$	$23.02 \pm 6.62$
	2000	$0.173 \pm 0.041$	$5.94 \pm 0.63$	$7.43 \pm 0.79$	$42.97 \pm 10.56$

i.3 Daten aus dem Projekt: Einfluss von Glycin, TMAO und Osmolytgemischen auf die druckabhängige katalytische Aktivität von  $\alpha$ -Chymotrypsin

*Tabelle i-4:* Berechnete Aktivierungsvolumina,  $\Delta V^\ddagger$ , der  $\alpha$ -CT-Reaktion für die jeweilige Substratkonzentration bei verschiedenen Osmolytgemischen.

	$c_{\text{Substrat}} /$ mM	$\Delta V^\ddagger /$ mL mol <sup>-1</sup>
Tris-Puffer	0.1	-17.76 ± 1.19
	0.25	-19.12 ± 1.69
	0.75	-16.10 ± 1.28
	2	-15.50 ± 0.39
	4	-15.31 ± 0.48
<i>Shallow shrimp</i> -Gemisch	0.1	-15.53 ± 0.65
	0.25	-13.63 ± 1.04
	0.75	-11.80 ± 0.48
	2	-11.94 ± 0.94
	4	-10.11 ± 0.71
<i>Deep sea</i> -Gemisch	0.1	-17.35 ± 0.61
	0.25	-17.43 ± 0.43
	0.75	-14.28 ± 0.36
	2	-14.15 ± 0.88
	4	-15.70 ± 1.00
Tris-Puffer + 1 M Glycin	0.1	-15.62 ± 0.46
	0.25	-15.51 ± 1.47
	0.75	-14.60 ± 1.12
	1.5	-13.31 ± 0.63
	3	-14.16 ± 0.87
Tris-Puffer + 1 M TMAO	0.1	-16.01 ± 0.71
	0.25	-15.40 ± 0.86
	0.75	-15.68 ± 0.71
	2	-13.41 ± 0.86
	4	-13.22 ± 0.42

## i.4 Daten aus dem Projekt: Stabilität des Chaperonin-Systems GroEL/GroES unter extremen Umweltbedingungen

*Tabelle i-5:* Spektroskopisch bestimmte Entfaltungstemperaturen und VAN'T HOFF-Enthalpieänderungen von GroEL, GroES und dem GroEL-GroES-Komplex (Molverhältnis 1:2) in Ab- und Anwesenheit verschiedener Salze und Cosolventien bei Umgebungsdruck. Für GroES konnten zwei strukturelle Übergänge (mit 1, 2 gekennzeichnet) beobachtet werden.

	$T_u / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{vH,u} / \text{kJ mol}^{-1}$
GroEL (Puffer A)	$69.1 \pm 0.2$	$998 \pm 61$
GroEL (Puffer A + 3 mM ADP)	$67.8 \pm 0.2$	$732 \pm 89$
GroEL (Puffer B)	$72.0 \pm 0.6$	$821 \pm 84$
GroEL (Puffer B + 3 mM ATP)	$70.9 \pm 0.5$	$788 \pm 79$
GroEL (Puffer B + 3 mM ATP + 10 mM $\text{Mg}^{2+}$ )	$70.6 \pm 0.4$	$835 \pm 37$
GroEL (Puffer B + 10 mM $\text{Mg}^{2+}$ )	$71.8 \pm 0.6$	$916 \pm 77$
GroEL (Puffer B + 1 M $^{13}\text{C}$ -Harnstoff)	$65.1 \pm 0.3$	$917 \pm 170$
GroEL (Puffer B + 1 M TMAO)	$73.7 \pm 0.6$	$732 \pm 91$
GroES (Puffer B)	1) $82.1 \pm 0.3$ 2) $87.1 \pm 0.6$	1) $691 \pm 92$ 2) $669 \pm 286$
GroES (Puffer B + 1 M $^{13}\text{C}$ - Harnstoff)	1) $80.0 \pm 1.2$ 2) $83.5 \pm 1.0$	1) $829 \pm 141$ 2) $1028 \pm 245$
GroES (Puffer B + 1 M TMAO)	1) $84.8 \pm 1.2$ 2) $87.8 \pm 0.6$	1) $822 \pm 133$ 2) $671 \pm 132$
GroEL-GroES (Puffer B)	$71.4 \pm 0.5$	$1007 \pm 144$
GroEL-GroES (Puffer B + 3 mM ATP + 10 mM $\text{Mg}^{2+}$ + 1 M $^{13}\text{C}$ - Harnstoff)	$67.2 \pm 0.4$	$863 \pm 70$
GroEL-GroES (Puffer B + 3 mM ATP + 10 mM $\text{Mg}^{2+}$ + 1 M TMAO)	$75.9 \pm 0.5$	$879 \pm 61$

*Tabelle i-6:* Spektroskopisch bestimmte Entfaltungsdrücke und Volumenänderungen der partiellen Entfaltung von GroES in Ab- und Anwesenheit verschiedener Cosolventien bei 25 °C.

	$p_u / \text{bar}$	$\Delta V_u / \text{mL mol}^{-1}$
GroES (Puffer B)	$5395 \pm 298$	$-52.9 \pm 11.8$
GroES (Puffer B + 1 M TMAO)	$5413 \pm 321$	$-54.8 \pm 7.8$
GroES (Puffer B + 1 M $^{13}\text{C}$ - Harnstoff)	$3552 \pm 85$	$-112.28 \pm 14.6$

i.4 Daten aus dem Projekt: Stabilität des Chaperonin-Systems GroEL/GroES unter extremen Umweltbedingungen

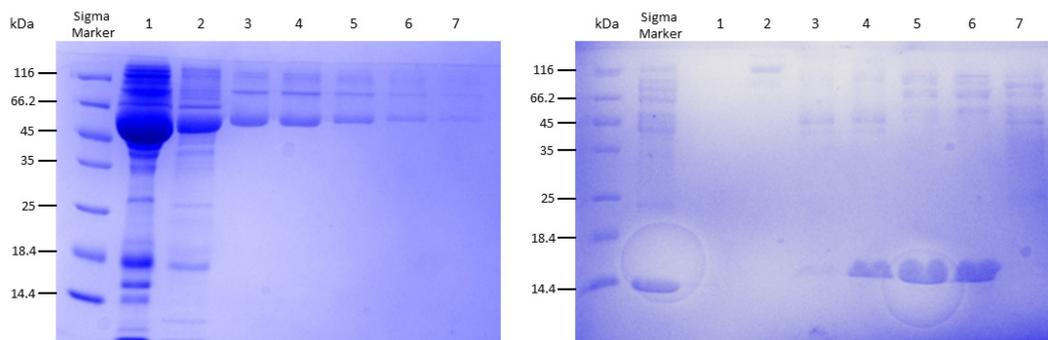


Abbildung i-1: SDS-Gel von GroEL (links) und GroES (rechts) vor (1) und nach der Aufreinigung mit den entsprechenden Pools (2-7). Spalte „Sigma Marker 26611“: Mehrere Molekularreferenzstandards (14.4 -116 kDa).

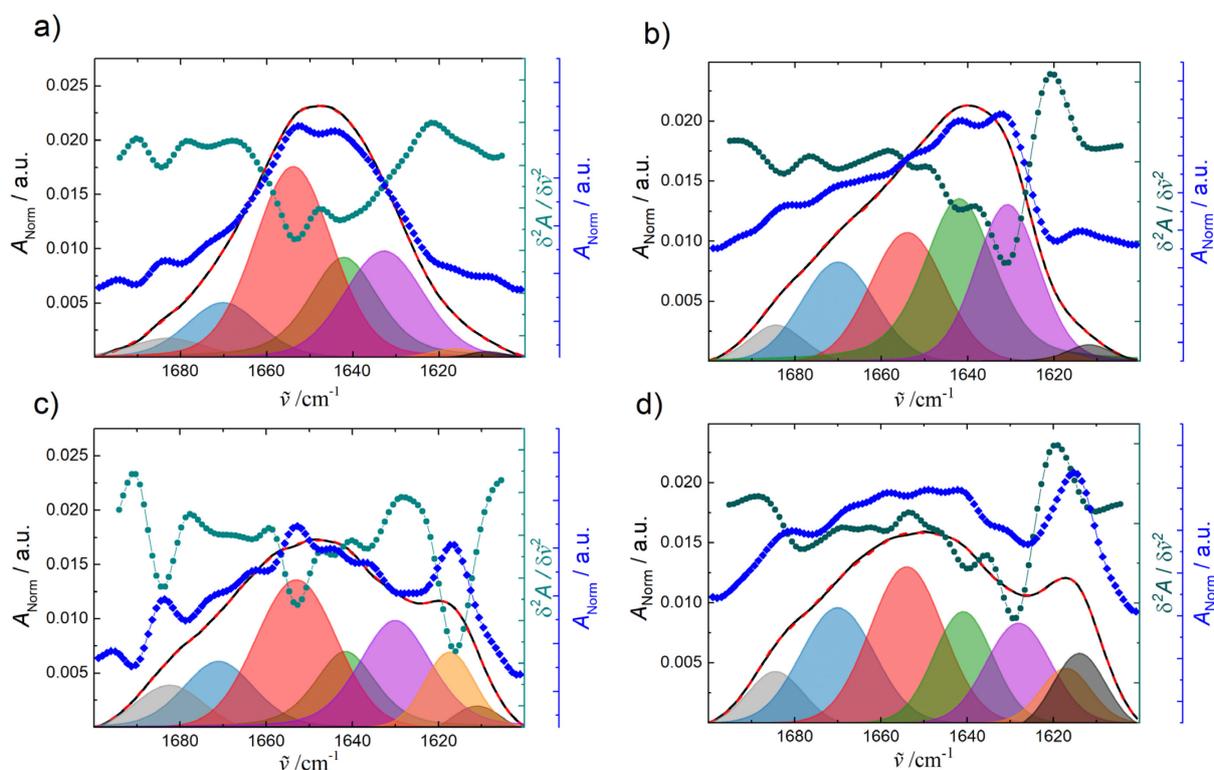


Abbildung i-2: Kurvenanpassungsergebnisse der temperaturabhängigen FTIR-Daten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei Umgebungsdruck: Amid-I'-Bandenbereich (schwarze Linie), die entsprechende Anpassung (rot, gestrichelte Linie), FSD-Spektrum (blau, quadratisch, gepunktete Linie) und bearbeitete Spektren nach der zweite Ableitung (dunkelcyan, gepunktete Linie) von GroEL bei 25 °C (a) und 86 °C (c) und von GroES bei 25 °C (b) und 96 °C (d) bei Umgebungsdruck: intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (grau und orange), Schleifen (blau),  $\alpha$ -Helices (rot), ungeordnete Strukturen (grün), intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (lila) und Seitenketten (schwarz).

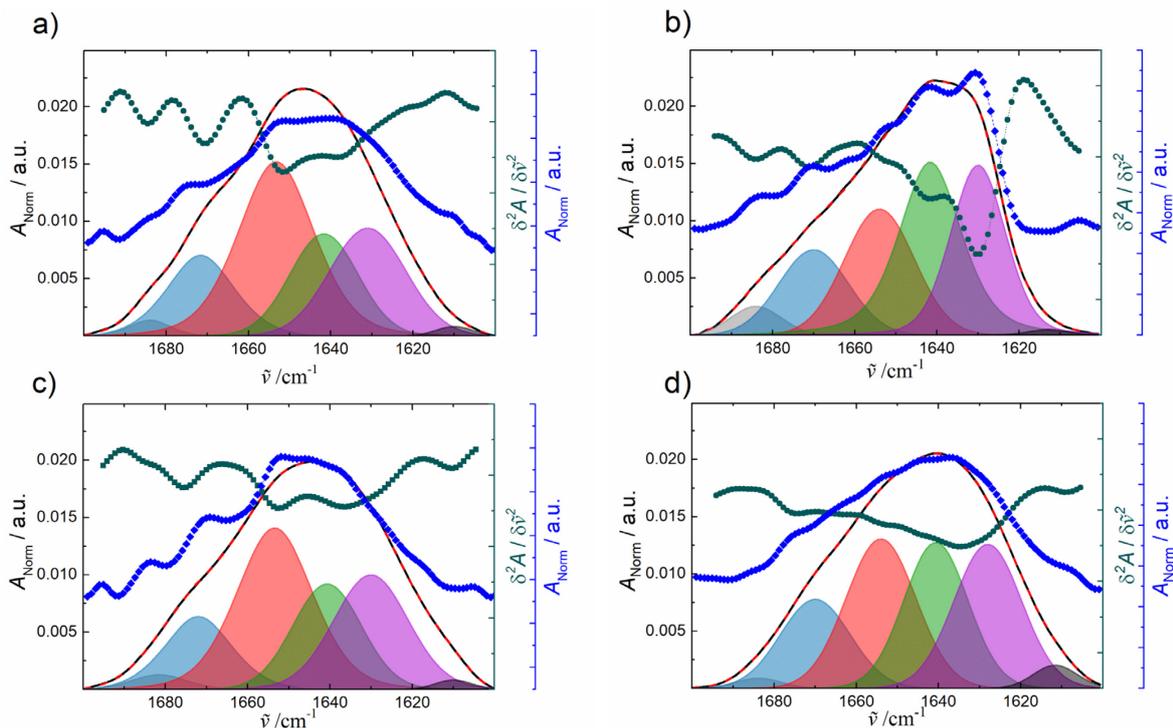


Abbildung i-3: Kurvenanpassungsergebnisse der druckabhängigen FTIR-Daten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei 25 °C: Amid-I'-Bandenbereich (schwarze Linie), die entsprechende Anpassung (rot, gestrichelte Linie), FSD-Spektrum (blau, quadratisch, gepunktete Linie) und bearbeitete Spektren nach der zweite Ableitung (dunkelcyan, gepunktete Linie) von GroEL bei 1 bar (a) und 10 kbar (c) und von GroES bei 1 bar (b) und 10 kbar (d) bei Umgebungsdruck: intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (grau), Schleifen (blau),  $\alpha$ -Helices (rot), ungeordnete Strukturen (grün), intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (lila) und Seitenketten (schwarz).

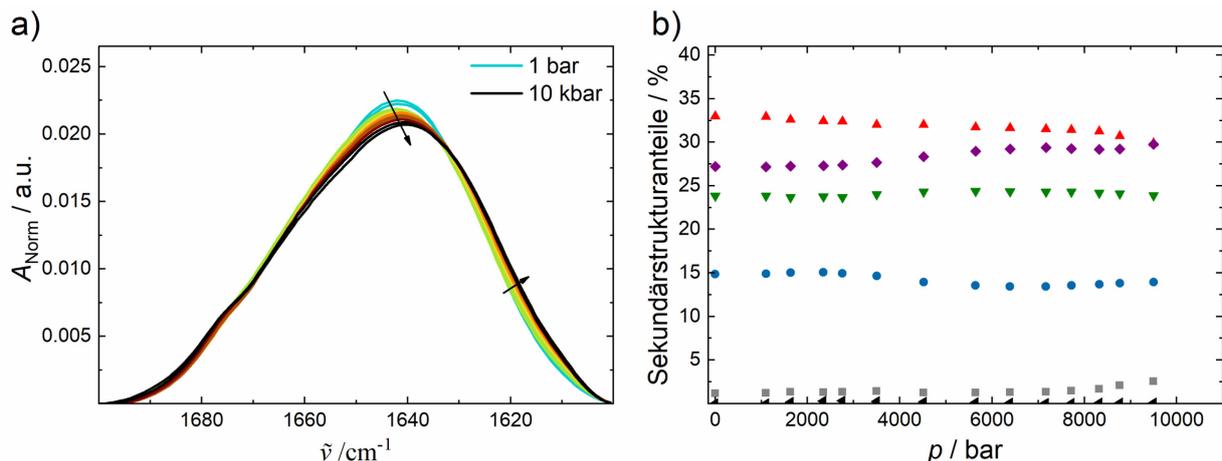


Abbildung i-4: Druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten des GroEL-GroES-Komplexes in reinem Puffer (Puffer B + 3 mM ATP und 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) bei 25 °C. a) Druckabhängige Änderungen der normierten Amid-I'-Bandenregion des GroEL-GroES-Komplexes und b) entsprechende Änderungen der Sekundärstrukturelemente unter Druck: intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ , grau), Schleifen (1672  $\text{cm}^{-1}$ , blau),  $\alpha$ -Helices (1653  $\text{cm}^{-1}$ , rot), ungeordnete Strukturen (1640  $\text{cm}^{-1}$ , grün), intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1632  $\text{cm}^{-1}$ , lila) und Seitenketten (1610  $\text{cm}^{-1}$ , schwarz).

i.5 Daten aus dem Projekt: Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des Arginin-Bindungsproteins *Thermotoga maritima* und seiner gefalteten Fragmente

### i.5 Daten aus dem Projekt: Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des Arginin-Bindungsproteins *Thermotoga maritima* und seiner gefalteten Fragmente

Tabelle i-7: Vergleich aller Sekundärstrukturelemente in Prozent aller gemessenen ArgBP-Varianten bei 1 bar, 10 kbar und nach der Dekompression bei 25 °C.

ArgBP-Varianten	Sekundärstrukturelemente	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Sekundärstrukturanteile in %		
			1 bar	~ 10 kbar	Dekompression
ArgBP <sup>20-246</sup>	■ $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1686	1	2	2
	● $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1677	4	4	4
	▲ $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1670	7	5	5
	▼ $\alpha$ -Helices	1654	35	29	31
	◀ intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	1638	30	39	35
	◆ ungeordnete Strukturen	1643	17	14	16
	▶ Seitenketten	1615	6	7	7
ArgBP <sup>20-233</sup>	■ $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1686	1	1	1
	● $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1678	4	5	4
	▲ $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1669	7	7	5
	▼ $\alpha$ -Helices	1654	33	26	31
	◀ intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	1638	31	39	36
	◆ ungeordnete Strukturen	1643	17	14	16
	▶ Seitenketten	1615	6	8	6
ArgBP <sup>D1</sup>	■ $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1680	6	5	7
	● $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1668	9	9	8
	▼ $\alpha$ -Helices	1654	29	25	31
	◀ intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	1638	30	34	27
	◆ ungeordnete Strukturen	1643	22	20	20
	▶ Seitenketten	1615	4	7	5
ArgBP <sup>D2</sup>	■ $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1684	4	5	4
	● $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1676	2	2	2
	▲ $\beta$ -Faltblätter oder Schleifen	1661	12	10	12
	▼ $\alpha$ -Helices	1652	26	22	26
	◀ intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	1637	37	42	37
	◆ ungeordnete Strukturen	1643	15	13	15
	▶ Seitenketten	1615	4	5	4

Tabelle i-8: Anteil der Sekundärstrukturelemente der ArgBP-Varianten anhand der PDB-Datenbank.

Protein	PDB-Code	$\alpha$ -Helices in %	$\beta$ -Faltblätter in %
ArgBP <sup>20-246</sup>	4PSH	38	28
ArgBP <sup>20-233</sup>	6GGV	28	23
ArgBP <sup>D1</sup>	6GPC	35	21
ArgBP <sup>D2</sup>	6GPM	29	26

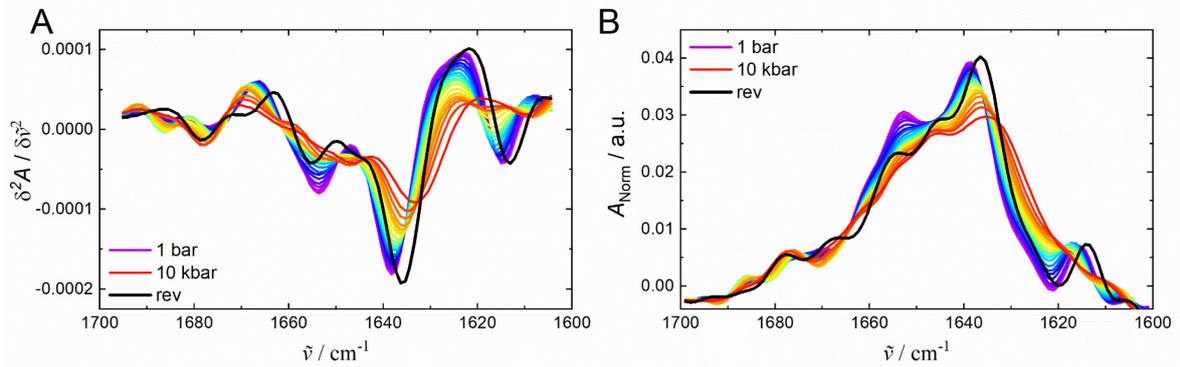
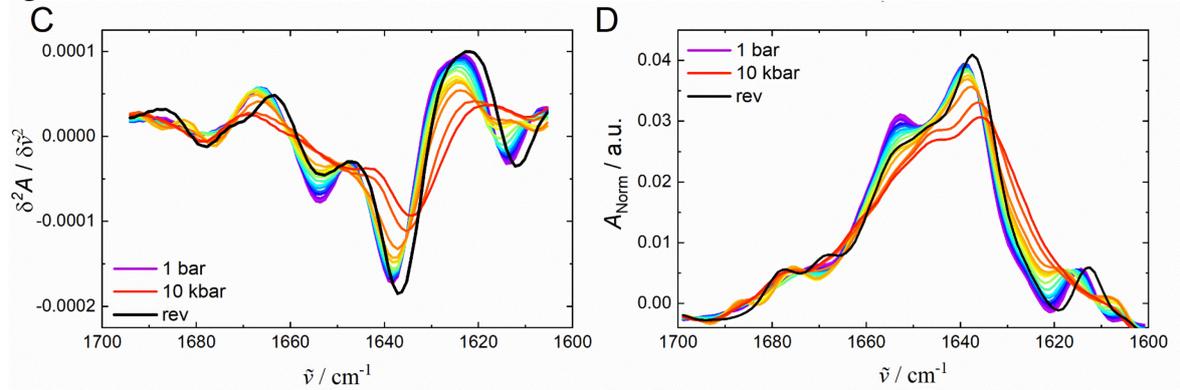
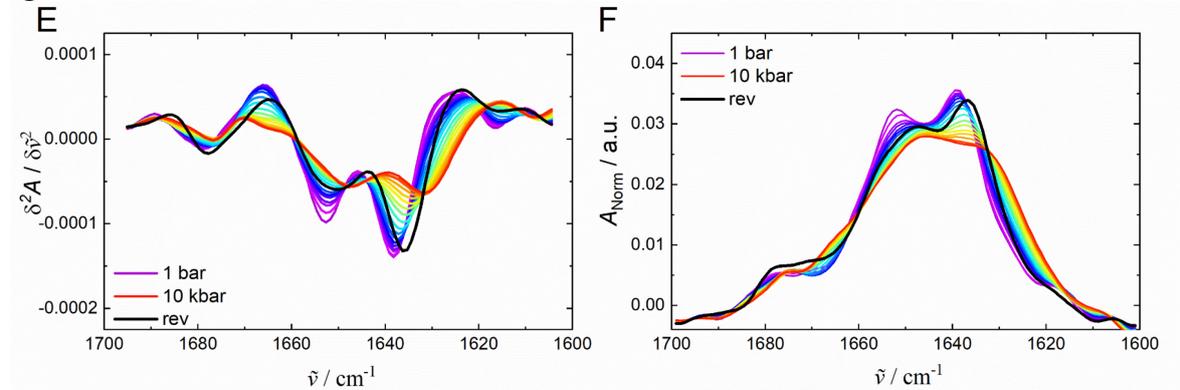
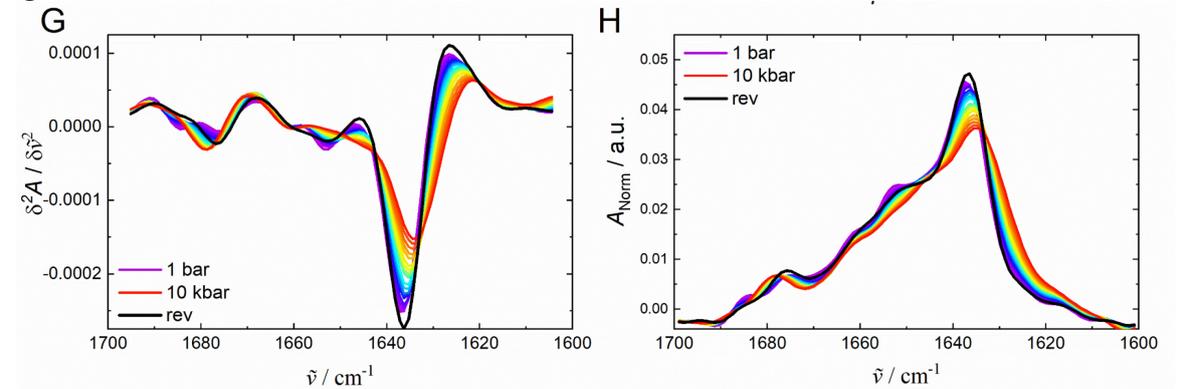
**ArgBP<sup>20\_246</sup>****ArgBP<sup>20\_233</sup>****ArgBP<sup>D1</sup>****ArgBP<sup>D2</sup>**

Abbildung i-5: Entsprechende FSD-Spektren (B, D, F, H) und 2<sup>nd</sup> derivative Spektren (A, C, E, G) aller ArgBP-Varianten bei 25 °C, siehe Abbildung 6-2.

i.5 Daten aus dem Projekt: Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des Arginin-Bindungsproteins Thermotoga maritima und seiner gefalteten Fragmente

*Tabelle i-9:* Entfaltungstemperaturen (Anzahl: 75) und Entfaltungsdrücke (Anzahl: 36) von Proteinen, soweit in der Literatur (Ref.) angegeben, unter Verwendung verschiedener Arten von Messmethoden. Hyper-/thermophile Proteine sind rot markiert, während mesophile Proteine in schwarz gekennzeichnet sind.

Protein	$T_u / ^\circ\text{C}$	Ref	Protein	$p_{u/d} / \text{bar}$	Ref
1. Tubulin ( <i>porcine brain</i> ) pH = 6.8	53 (D) 62	[318]	1. Tubulin ( <i>porcine brain</i> ) pH = 6.8	1300 (D) (25 °C)	[318]
2. $\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>bovine pancreas</i> ) pH = 7.0	41	[262]	2. $\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>bovine pancreas</i> ), pH = 7.0	4900 (21 °C)	[262]
3. Cytochrome C ( <i>horse</i> ) pH = 7.0	60	[319]	3. Cytochrome C ( <i>horse</i> ) pH = 7.0	9000 (20 °C)	[319]
4. G-Aktin ( <i>rabbit skeletal muscle</i> ) pH = 7.8	56	[320]	4. G-Aktin ( <i>rabbit skeletal muscle</i> ) pH = 7.8	2000 (20 °C)	[320]
5. Ubiquitin pD = 7.0	82	[321]	5. Ubiquitin pD = 7.0	5200 (20 °C)	[321]
6. Rs GFP ( <i>Aequorea victoria</i> ) pD = 5.5	78	[322]	6. Rs GFP ( <i>Aequorea victoria</i> ) pD = 5.5	8600 (25 °C)	[322]
7. Chymotrypsinogen pH = 2.0	42	[261]	7. Chymotrypsinogen pH = 2.0	3500 (20 °C)	[261]
8. Ribonuclease A ( <i>bovine pancreas</i> ) pD = 7.0	65	[323]	8. Ribonuclease A ( <i>bovine pancreas</i> ), pD = 7.0	7500 (30 °C)	[323]
9. Lipoxygenase ( <i>soaked soybeans</i> ) pH = 7.8	68	[324]	9. Lipoxygenase ( <i>soaked soybeans</i> ) pH = 7.8	6000	[324]
10. $\beta$ -Lactoglobulin A ( <i>bovine</i> ) pH=7.0	60	[325]	10. $\beta$ -Lactoglobulin A ( <i>bovine</i> ) pH = 7.0	1500 (D) (20° C)	[325]
11. Metmyoglobin ( <i>Sperm whale</i> ) pH = 9.0	78	[326]	11. Metmyoglobin ( <i>Sperm whale</i> ) pH = 9.0	6000 (20° C)	[326]
12. Staphylococcal nuclease ( <i>Staphylococcus aureus</i> ), pD = 5.5	48	[327]	12. Staphylococcal nuclease ( <i>Staphylococcus aureus</i> ), pD = 5.5	2100 (25 °C)	[327]
13. Lysozyme pD = 7.4	77	[139]	13. Lysozyme pD = 7.4	6000 (25° C)	[139]
14. Titin I27 pD = 7.0	65	[328]	14. Titin I27 pD = 7.0	11000 (30°C)	[328]
15. Fluorescein binding Lipocalin FluA	47	[329]	15. Fluorescein binding Lipocalin FluA	1700 (25 °C)	[329]
16. Equine serum albumin pD = 4.4	57	[330]	16. Equine serum albumin pD = 4.4	4000 (25 °C)	[330]
17. Arc repressor pH = 7.5	68	[331]	17. Arc repressor pH = 7.5	1000 (D)	[332]
18. Ovalbumin pH = 7.0	77	[333]	18. Lactatdehydrogenase ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> ), pH = 7.6	1500 (T) (20 °C)	[334]
19. Bovine serum albumin pH = 7.0	65	[333]	19. Yeast Hexokinase pH = 7.5	800 (D) (30 °C)	[335]
20. Maltodextrin Glucosidase pH = 7.4	52	[336]	20. Yeast Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pH = 7.5	990 (T)	[337]
21. Baker's Yeast enolase pH = 7.2	58	[338]	21. Yeast enolase pH = 7.1	< 2400 (D)	[339]
22. Yeast 3-Phosphoglycerate kinase pH = 7.0	54	[340]	22. Phosphofruktokinase ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 8.2	< 2000 (D) (25 °C)	[341]
23. GroEL ( <i>Escherichia coli</i> ) pH = 7.6	70	[188]	23. GroEL ( <i>Escherichia coli</i> ) pH = 7.6	~ 2000 (O) (20 °C)	[197]
24. GroES ( <i>Escherichia coli</i> ) pH = 7.6	76	[188]	24. GroES ( <i>Escherichia coli</i> ) pH = 7.6	2500 (O) (20 °C)	[197]
25. Papain ( <i>Latex of the papaya fruit</i> ) pH = 5.6	83	[342]	25. Alkaline phosphatase ( <i>Escherichia coli</i> )	8200	[343]
26. Immunoglobulin (monoclonal mouse anti-rat antibody of isotype 2b) pH = 8.1	71 (Fc)-do- main	[344]	26. Pyruvatkinase ( <i>Rabbit muscle</i> ) pH = 7.5	< 3500 (T) (25 °C)	[345]
27. Carbonic anhydrase, isozyme I, human erythrocytes, pH = 6.1	59	[346]	27. Lactose repressor protein ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 7.5	~ 1400 (T)	[347]

## Anhang

i.5 Daten aus dem Projekt: Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des Arginin-Bindungsproteins *Thermotoga maritima* und seiner gefalteten Fragmente

28. Bovine pancreatic trypsin inhibitor pH = 7.0	100	[348]	28. Bovine pancreatic trypsin inhibitor, pD = 7.0	5500 (25°C)	[349]
29. Adenylate kinase ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 7.0	52	[350]	29. Insulin pH = 2.0	-	[351]
30. DNA Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> ), pH = 9.5	97.6	[352]	30. N-Ras pD = 7.4	- (25 °C)	[101]
31. $\alpha$ -Amylase ( <i>Bacillus sp.</i> ) pH = 5.9	61	[353]	31. Cold shock protein A ( <i>Escherichia coli</i> )	1500	[354]
32. Horse radish peroxidase pH = 7.0	74	[355]	32. Hemoglobin ( <i>Glossoscolex paulistus</i> ), pH = 7.5	1700 (D) (20 °C)	[356]
33. F-Actin pD = 7.8	63.1	[223]	33. F-Actin pD = 7.8	3500 (O) (20 °C)	[223]
34. Microtubuli ( <i>calf brain</i> ) pD = 6.8	76.3	[223]	34. HIV-1 protease pH = 8.0	2600	[357]
35. Hsp90 ( <i>porcine brain</i> ) pH = 7.0	62.8	[358]	35. Urate oxidase ( <i>Aspergillus flavus</i> ), pH = 8.0	1750 (T) (25 °C)	[359]
36. Lipase ( <i>Pseudomonas cepacia</i> ) pH = 7.0	75.2	[360]	36. Leucine rich repeat domain of Anp32 tumor suppressor protein	1300 (20 °C)	[42]
37. Rubisco ( <i>Lucerne</i> ) pH = 7.5	67.2	[361]	Protein	$T_u / ^\circ\text{C}$	Ref
38. Maltose binding protein ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 7.4	63	[362]	56. Small cold shock protein ( <i>Thermotoga maritima</i> ), pH = 6.5	88	[363]
39. Oxy-Hemoglobin ( <i>Glossoscolex paulistus</i> ), pH = 7.0	60.2	[364]	57. DNA ligase ( <i>Thermus scoloductus</i> ), pH = 7.0	95.3	[365]
40. Trisephosphate isomerase ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ), pH = 8.5	59.1	[366]	58. Triosephosphate Isomerase ( <i>Thermoplasma acidophilum</i> ), pH = 7.5	74	[367]
41. Formate-Dehydrogenase ( <i>Candida boidinii</i> ), pH = 7.5	57	[279]	59. Triosephosphate Isomerase ( <i>Thermotoga maritima</i> ), pH = 7.5	102	[367]
42. Luciferase ( <i>Firefly</i> ) pH=7.8	42	[368]	60. Cytochrome c ( <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> ) pH = 7.5	88.1	[369]
43. Leucoagglutinin ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) pH = 3.0	86	[370]	61. Farnesyldi-phosphate/geranyl- geranyl diphosphate synthase ( <i>Thermococcus kodakaraensis</i> ), pH = 8.0	91	[371]
44. Dihydrofolate reductase ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 7.0	46	[372]	62. Pyrrolidone carboxyl peptidase ( <i>Pyrococcus furiosus</i> ), pH = 9.5	115.5	[373]
45. Leucine-isoleucine-valine binding protein, pH = 7.0	67	[374]	63. Glutamate Dehydrogenase ( <i>Pyrococcus furiosus</i> ), pH = 8.0	113	[375]
46. Rhodopsin pH = 6.9	63.8	[376]	64. Methylguanine-DNA-methyltrans- ferase ( <i>Thermococcus kodakaraensis</i> ), pH = 8.0	98.6	[377]
47. Bacteriorhodopsin pH = 7.4	67.5	[378]	65. Methylguanine-DNA-methyltrans- ferase ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 8.0	43.8	[377]
48. $\alpha$ -Crystallin ( <i>bovine lens</i> ), pH = 7.2	61	[379]	66. Alcohol dehydrogenase ( <i>Thermoanaerobacter brockii</i> ), pH = 7.5	87	[380]
49. DNA ligase ( <i>Escherichia coli</i> ) pH = 7.0	53.9	[365]	67. Alcohol dehydrogenase ( <i>yeast</i> ) pH = 7.5	60	[380]
50. Tetracycline repressor pH = 8.0	59	[381]	68. Plastocyanin ( <i>Phormidium laminosum</i> ), pH = 5.5	Ox: 83,1 Red: 76,4	[382]
51. 3-isopropylmalate dehydrogenase ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 7.0	63	[383]	70. L-arabinose isomerases ( <i>Bacillus halodurans</i> ), pH = 8.0	71	[384]
52. 3-isopropylmalate dehydrogenase ( <i>Thermus thermophilus</i> ), pH = 7.0	83	[383]	71. L-arabinose isomerases ( <i>Thermotoga maritima</i> ), pH = 7.0	91	[384]
53. Aspartate aminotransferase ( <i>Sulfolobus solfataricus</i> ), pH = 7.5	85	[385]	72. Xylanase ( <i>Clostridium thermocellum</i> ), pH = 7.5	81,4	[386]
54. RNase H ( <i>Thermus thermophilus</i> ) pH = 5.5	82	[387]	73. Ferredoxin ( <i>Thermus thermophiles</i> ), pH = 7.2	114	[388]
55. Phosphoglycerate kinase ( <i>Thermus thermophilus</i> ), pH = 7.5	91	[389]	74. Streptavidin pH = 7.4	75.5	[390]
55. $\alpha$ -Amylase ( <i>thermophilic org.</i> )	86	[391]	75. Avidin pH = 7.4	83	[390]

i.5 Daten aus dem Projekt: Eine Hochdruck-FTIR-Spektroskopiestudie zur außergewöhnlichen Druckstabilität des Arginin-Bindungsproteins *Thermotoga maritima* und seiner gefalteten Fragmente

*Tabelle i-10:* Verwendete Entfaltungstemperaturen und -drücke von Proteinen, die für die Auftragung des Einschubs in Abbildung 6-4 verwendet worden sind.

$T_u / ^\circ\text{C}$	$p_{u/d} / \text{bar}$	Protein
41	4900	$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>bovine pancreas</i> ), pH = 7.0
42	3500	Chymotrypsinogen, pH = 2.0
47	1700	Fluorescein binding Lipocalin FluA
48	2100	Staphylococcal nuclease ( <i>Staphylococcus aureus</i> ), pD = 5.5
53	1300	Tubulin ( <i>porcine brain</i> ), pH = 6.8
56	2000	G-Aktin ( <i>rabbit skeletal muscle</i> ), pH = 7.8
57	4000	Equine serum albumin, pD = 4.4
60	1500	$\beta$ -Lactoglobulin A ( <i>bovine</i> ), pH=7.0
60	9000	Cytochrome C ( <i>horse</i> ), pH = 7.0
63.1	3500	F-Aktin, pD = 7.8
65	7500	Ribonuclease A ( <i>bovine pancreas</i> ), pD = 7.0
65	11000	Titin I27, pD = 7.0
68	1000	Arc repressor, pH = 7.5
68	6000	Lipoxygenase ( <i>soaked soybeans</i> ), pH = 7.8
76	2500	GroES ( <i>Escherichia coli</i> ), pH = 7.6
77	6000	Lysozyme, pD = 7.4
78	6000	Metmyoglobin ( <i>Sperm whale</i> ), pH = 9.0
78	8600	Rs GFP ( <i>Aequorea victoria</i> ), pD = 5.5
82	5200	Ubiquitin, pD = 7.0
100	5500	Bovine pancreatic trypsin inhibitor, pH = 7.0

## i.6 Daten aus dem Projekt: Druckeinfluss auf die Enzymaktivität unter Perchloratstress: Auswirkungen auf die Bewohnbarkeit des Mars

*Tabelle i-11:* Berechnete kinetische Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M = k_{eff}$ )) der  $\alpha$ -CT-Reaktion für alle untersuchten Drücke und Salzlösungen bei  $T = 20\text{ °C}$ .

Messlösung	$p / \text{bar}$	$K_M / \text{mM}$	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$	$k_{eff} / \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$
Tris-Puffer	1	$1.756 \pm 0.207$	$0.0361 \pm 0.0020$	$20.567 \pm 2.663$
	500	$1.038 \pm 0.199$	$0.0409 \pm 0.0030$	$39.372 \pm 8.084$
	1000	$0.855 \pm 0.134$	$0.0477 \pm 0.0027$	$55.715 \pm 9.290$
	1500	$0.670 \pm 0.070$	$0.0559 \pm 0.0019$	$83.427 \pm 9.170$
	2000	$0.588 \pm 0.068$	$0.0680 \pm 0.0025$	$115.573 \pm 14.102$
+ 0.25 M $\text{MgSO}_4$	1	$0.769 \pm 0.088$	$0.0323 \pm 0.0013$	$42.018 \pm 5.102$
	500	$0.600 \pm 0.074$	$0.0420 \pm 0.0016$	$69.974 \pm 9.026$
	1000	$0.417 \pm 0.058$	$0.0474 \pm 0.0018$	$113.770 \pm 16.340$
	1500	$0.295 \pm 0.018$	$0.0539 \pm 0.0018$	$182.610 \pm 12.857$
	2000	$0.296 \pm 0.036$	$0.0704 \pm 0.0021$	$237.876 \pm 30.133$
+ 0.5 M $\text{MgSO}_4$	1	$0.438 \pm 0.159$	$0.0330 \pm 0.0016$	$75.392 \pm 13.062$
	500	$0.330 \pm 0.070$	$0.0437 \pm 0.0023$	$132.299 \pm 28.828$
	1000	$0.258 \pm 0.049$	$0.0498 \pm 0.0021$	$193.376 \pm 37.344$
	1500	$0.221 \pm 0.035$	$0.0612 \pm 0.0021$	$277.317 \pm 45.021$
	2000	$0.187 \pm 0.028$	$0.0752 \pm 0.0022$	$401.408 \pm 60.324$
+ 0.25 M $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	1	$0.872 \pm 0.159$	$0.0267 \pm 0.0018$	$30.551 \pm 5.912$
	500	$0.826 \pm 0.143$	$0.0383 \pm 0.0024$	$46.332 \pm 8.520$
	1000	$0.675 \pm 0.073$	$0.0434 \pm 0.0016$	$64.266 \pm 7.363$
	1500	$0.593 \pm 0.050$	$0.0530 \pm 0.0014$	$89.393 \pm 7.878$
	2000	$0.520 \pm 0.048$	$0.0651 \pm 0.0018$	$125.073 \pm 11.951$
+ 0.5 M $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	1	$1.287 \pm 0.161$	$0.0288 \pm 0.0015$	$22.396 \pm 3.030$
	500	$0.899 \pm 0.099$	$0.0358 \pm 0.0014$	$39.811 \pm 4.666$
	1000	$0.766 \pm 0.078$	$0.0408 \pm 0.0013$	$53.340 \pm 5.715$
	1500	$0.621 \pm 0.052$	$0.0470 \pm 0.0013$	$75.641 \pm 6.639$
	2000	$0.564 \pm 0.032$	$0.0556 \pm 0.0010$	$98.450 \pm 5.899$

i.6 Daten aus dem Projekt: Druckeinfluss auf die Enzymaktivität unter Perchloratstress: Auswirkungen auf die Bewohnbarkeit des Mars

*Tabelle i-12:* Berechnete Aktivierungsvolumina für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SPpNA bei verschiedenen Salzlösungen ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Messlösung	$\Delta V^{\ddagger} / \text{mL mol}^{-1}$
Tris-Puffer	$-7.8 \pm 0.4$
+ 0.25 M MgSO <sub>4</sub>	$-9.0 \pm 0.8$
+ 0.5 M MgSO <sub>4</sub>	$-9.9 \pm 0.6$
+ 0.25 M Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$-10.5 \pm 1.0$
+ 0.5 M Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$7.9 \pm 0.4$

*Tabelle i-13:* Berechnete Aktivierungsvolumina in Abhängigkeit der Substratkonzentration für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SPpNA bei verschiedenen Salzlösungen ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

	$c_{\text{Substrat}} / \text{mM}$	$\Delta V^{\ddagger} / \text{mL mol}^{-1}$
Tris-Puffer	0.25	$-16.8 \pm 2.5$
	0.5	$-16.2 \pm 0.7$
	1	$-14.0 \pm 0.9$
	2	$-12.3 \pm 0.7$
	4	$-10.5 \pm 0.3$
+ 0.25 M MgSO <sub>4</sub>	0.25	$-16.6 \pm 0.6$
	0.5	$-14.8 \pm 0.9$
	1	$-13.3 \pm 0.6$
	2	$-11.6 \pm 0.6$
	4	$-10.4 \pm 0.9$
+ 0.5 M MgSO <sub>4</sub>	0.25	$-14.6 \pm 1.2$
	0.5	$-13.2 \pm 0.6$
	1	$-12.7 \pm 0.8$
	2	$-11.3 \pm 0.5$
	4	$-10.5 \pm 0.7$
+ 0.25 M Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.25	$-15.6 \pm 1.8$
	0.5	$-15.3 \pm 1.0$
	1	$-11.8 \pm 0.3$
	1.5	$-12.7 \pm 0.7$
	3	$-11.5 \pm 1.1$
+ 0.5 M Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.25	$-14.1 \pm 1.6$
	0.5	$-13.7 \pm 0.8$
	1	$-13.1 \pm 1.4$
	2	$-10.5 \pm 0.7$
	4	$-9.7 \pm 0.7$

*Tabelle i-14:* Quantitative Schätzung der Sekundärstrukturanteile von  $\alpha$ -CT mittels FTIR im Vergleich zu Literaturdaten nach verschiedenen Methoden.

Protein	Methode	$\alpha$ -Helices (%)	$\beta$ -Faltblätter (%)	Ungeordnete Strukturen (%)	Schleifen (%)
$\alpha$ -Chymotrypsin	FTIR	9	42	15	22
	X-Ray <sup>[84]</sup>	9	34	57* (*Verbleibender Anteil)	
	X-Ray <sup>[260]</sup>	8	50	15	27
	FTIR <sup>[392]</sup>	14	47	14	30
	FTIR <sup>[259]</sup>	11	49	18	21

### i.7 Daten aus dem Projekt: Erforschung der enzymatischen Aktivität im Multiparameterraum: Cosolventien, makromolekulare *Crowder* und Druck

*Tabelle i-15:* Berechnete kinetische Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M = k_{eff}$ ) der  $\alpha$ -CT-Reaktion für alle untersuchten Drücke und Messlösungen ( $T = 25\text{ °C}$ ).

Pufferlösung	$p / \text{bar}$	$K_M / \mu\text{M}$	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$	$k_{eff} / \text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$
Tris-Puffer	1	$82 \pm 8$	$31 \pm 1$	$380 \pm 39$
	500	$87 \pm 11$	$39 \pm 2$	$456 \pm 62$
	1000	$95 \pm 13$	$47 \pm 2$	$493 \pm 72$
	1500	$103 \pm 16$	$54 \pm 3$	$523 \pm 85$
	2000	$112 \pm 19$	$61 \pm 4$	$545 \pm 98$
+ 1 M TMAO	1	$53 \pm 10$	$40 \pm 2$	$759 \pm 146$
	500	$69 \pm 18$	$51 \pm 4$	$743 \pm 203$
	1000	$69 \pm 11$	$57 \pm 3$	$823 \pm 142$
	1500	$69 \pm 10$	$61 \pm 3$	$891 \pm 137$
	2000	$72 \pm 3$	$62 \pm 1$	$859 \pm 42$
+ 2 M Harnstoff	1	$234 \pm 19$	$38 \pm 1$	$161 \pm 14$
	500	$268 \pm 15$	$48 \pm 1$	$180 \pm 11$
	1000	$306 \pm 21$	$57 \pm 2$	$187 \pm 14$
	1500	$325 \pm 30$	$62 \pm 3$	$192 \pm 20$
	2000	$342 \pm 19$	$68 \pm 2$	$199 \pm 12$
+ 10 gew.-% Dextran	1	$91 \pm 17$	$33 \pm 2$	$360 \pm 72$
	500	$113 \pm 40$	$43 \pm 6$	$382 \pm 145$
	1000	$115 \pm 41$	$50 \pm 7$	$433 \pm 166$
	1500	$114 \pm 57$	$57 \pm 7$	$500 \pm 184$
	2000	$112 \pm 25$	$64 \pm 5$	$568 \pm 133$
+ 10 gew.-% PEG	1	$113 \pm 10$	$59 \pm 2$	$521 \pm 47$
	500	$135 \pm 16$	$73 \pm 3$	$540 \pm 67$
	1000	$167 \pm 10$	$91 \pm 2$	$541 \pm 35$
	1500	$185 \pm 7$	$102 \pm 2$	$550 \pm 24$
	2000	$224 \pm 12$	$115 \pm 3$	$513 \pm 30$
+ 10 gew.-% Dextran + 1 M TMAO	1	$91 \pm 4$	$41 \pm 1$	$456 \pm 21$
	500	$84 \pm 8$	$48 \pm 2$	$575 \pm 57$
	1000	$84 \pm 7$	$55 \pm 1$	$655 \pm 54$
	1500	$85 \pm 7$	$61 \pm 2$	$715 \pm 63$
	2000	$84 \pm 8$	$64 \pm 2$	$762 \pm 76$
+ 10 gew.-% Dextran + 2 M Harnstoff	1	$227 \pm 40$	$44 \pm 3$	$192 \pm 37$
	500	$209 \pm 29$	$50 \pm 3$	$237 \pm 36$
	1000	$242 \pm 40$	$57 \pm 4$	$237 \pm 43$
	1500	$231 \pm 17$	$61 \pm 2$	$262 \pm 21$
	2000	$274 \pm 14$	$70 \pm 2$	$256 \pm 15$
+ 10 gew.-% Dextran + 2 M Harnstoff	1	$171 \pm 36$	$37 \pm 3$	$218 \pm 50$
	500	$177 \pm 25$	$45 \pm 3$	$252 \pm 38$
	1000	$196 \pm 20$	$49 \pm 2$	$251 \pm 29$

i.7 Daten aus dem Projekt: Erforschung der enzymatischen Aktivität im Multiparameterraum:  
Cosolventien, makromolekulare Crowder und Druck

+ 1 M TMAO	1500	221 ± 28	52 ± 3	234 ± 33
	2000	225 ± 27	51 ± 3	226 ± 30
+ 10 gew.-% PEG + 1 M TMAO	1	125 ± 17	71 ± 4	572 ± 83
	500	141 ± 19	84 ± 5	599 ± 87
	1000	169 ± 21	96 ± 5	568 ± 75
	1500	202 ± 19	104 ± 4	517 ± 54
	2000	246 ± 21	113 ± 4	458 ± 43
+ 10 gew.-% PEG + 2 M Harnstoff	1	331 ± 21	65 ± 2	196 ± 14
	500	368 ± 21	81 ± 2	221 ± 14
	1000	400 ± 29	90 ± 4	226 ± 19
	1500	449 ± 27	99 ± 3	221 ± 15
	2000	517 ± 36	106 ± 4	205 ± 16
+ 10 gew.-% PEG + 2 M Harnstoff + 1 M TMAO	1	181 ± 16	62 ± 2	343 ± 32
	500	182 ± 6	68 ± 1	375 ± 13
	1000	253 ± 8	81 ± 1	322 ± 12
	1500	324 ± 19	92 ± 3	285 ± 19
	2000	453 ± 33	106 ± 4	233 ± 19

Tabelle i-16: Berechnete Aktivierungsvolumina,  $\Delta V^\ddagger$ , für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SAAPPpNA bei verschiedenen Pufferlösungen ( $T = 25$  °C).

Pufferlösung	$\Delta V^\ddagger / \text{mL mol}^{-1}$
Tris-Puffer	-8.2 ± 0.6
+ 1 M TMAO	-5.1 ± 1.2
+ 2 M Harnstoff	-7.1 ± 1.0
+ 10 gew.-% Dextran	-8.0 ± 0.9
+ 10 gew.-% PEG	-8.3 ± 0.7
+ 10 gew.-% Dextran + 2 M Harnstoff	-5.7 ± 0.4
+ 10 gew.-% Dextran + 1 M TMAO	-3.8 ± 1.1
+ 10 gew.-% Dextran + 1 M TMAO + 2 M Harnstoff	-5.4 ± 0.6
+ 10 gew.-% PEG + 2 M Harnstoff	-5.8 ± 0.8
+ 10 gew.-% PEG + 1 M TMAO	-5.6 ± 0.5
+ 10 gew.-% PEG + 1 M TMAO + 2 M Harnstoff	-6.8 ± 0.3

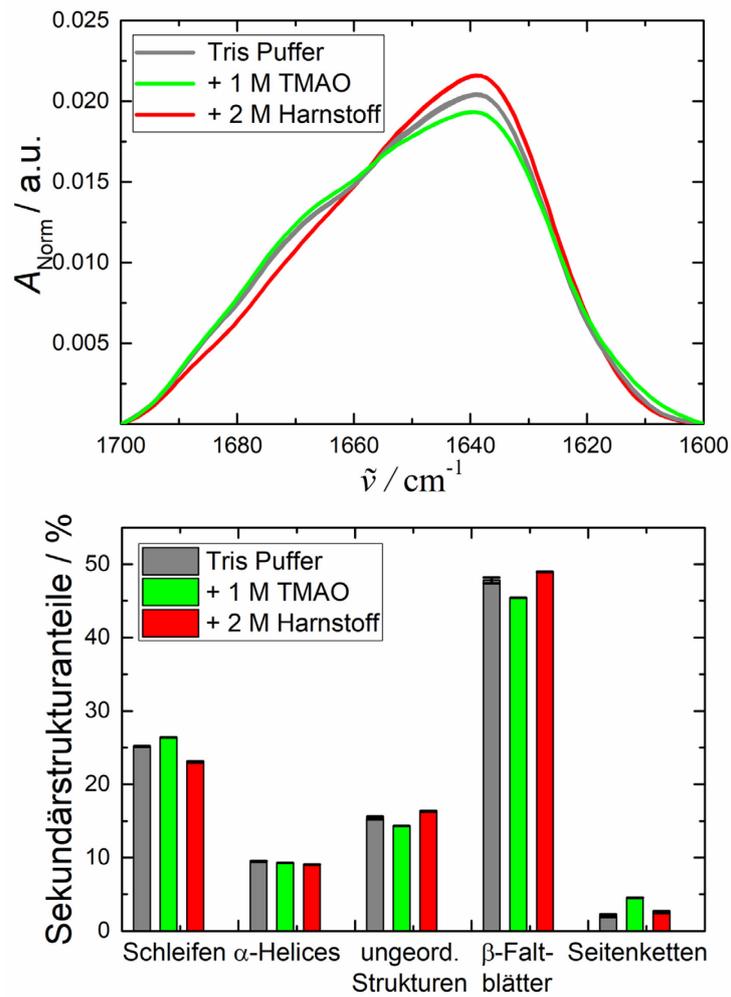


Abbildung i-6: Normierte FTIR-Spektren von  $\alpha$ -CT ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) für verschiedene Lösungsbedingungen (reiner Puffer:  $100 \text{ mM Tris} + 10 \text{ mM CaCl}_2$ ) bei Umgebungsdruck und bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , sowie die entsprechenden Sekundärstrukturkomponenten.

i.7 Daten aus dem Projekt: Erforschung der enzymatischen Aktivität im Multiparameterraum:  
Cosolventien, makromolekulare Crowder und Druck

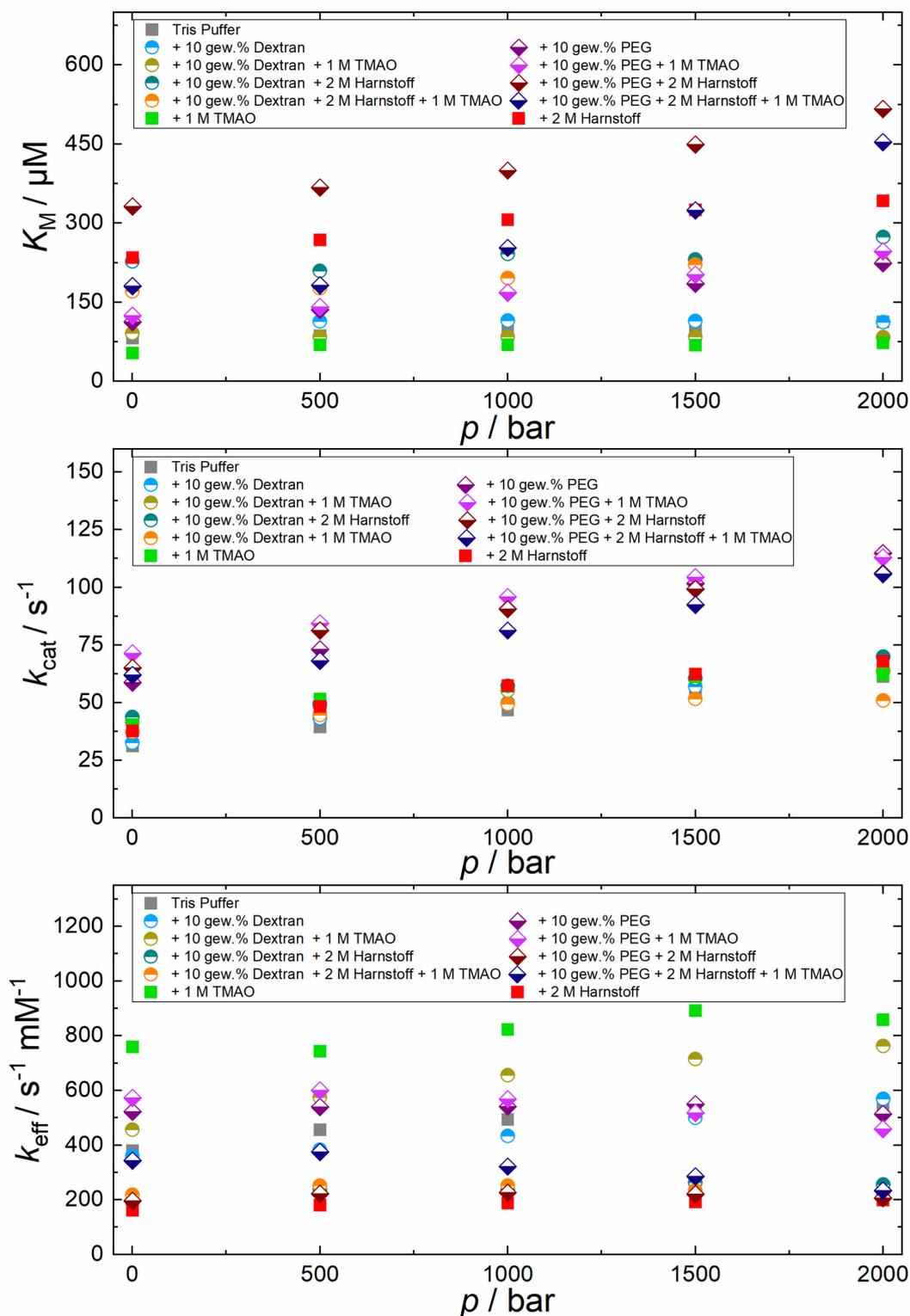


Abbildung i-7: Druckabhängigkeit der kinetischen Größen (MICHAELIS-Konstante, Wechselzahl, katalytische Effizienz) der  $\alpha$ -CT-katalysierten Hydrolyse von SAAPPpNA in verschiedenen Lösungen. Standardabweichungen sind in Tabelle i-15 angegeben.

## i.8 Daten aus dem Projekt: Optimierung der Formiatdehydrogenase-Aktivität durch Cosolute, Temperatur und Druck

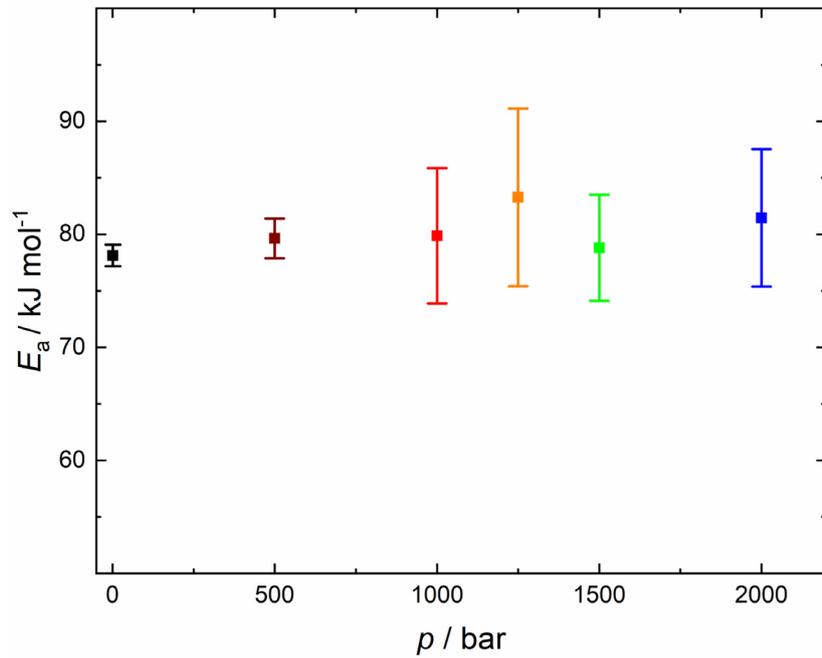
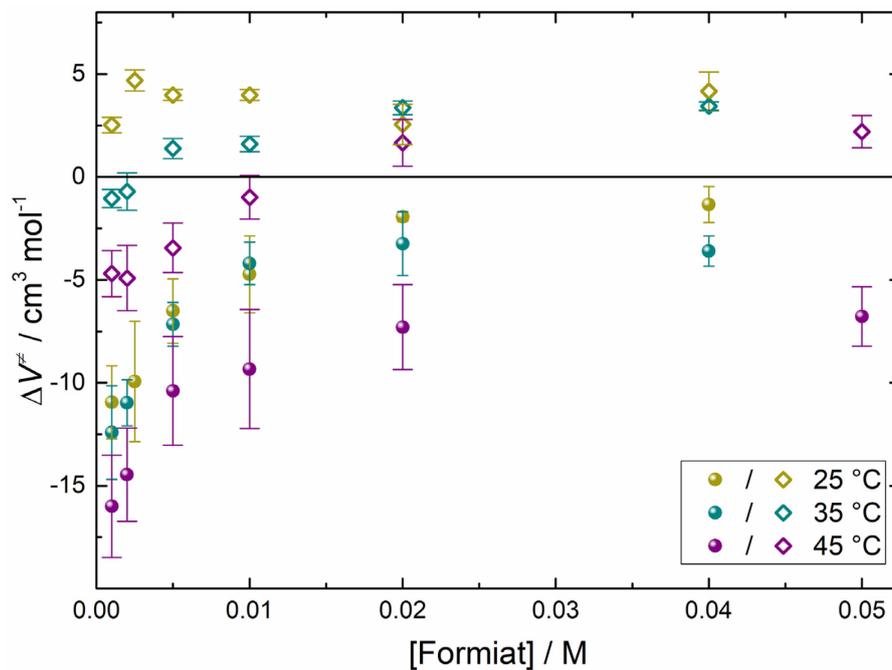


Abbildung i-8: Druckabhängigkeit der Aktivierungsenergie der FDH-Reaktion.

Abbildung i-9: Aktivierungsvolumen,  $\Delta V^\ddagger$ , in Abhängigkeit der Substratkonzentration, [Formiat], bei verschiedenen Temperaturen.

i.8 Daten aus dem Projekt: Optimierung der Formiatdehydrogenase-Aktivität durch Cosolute, Temperatur und Druck

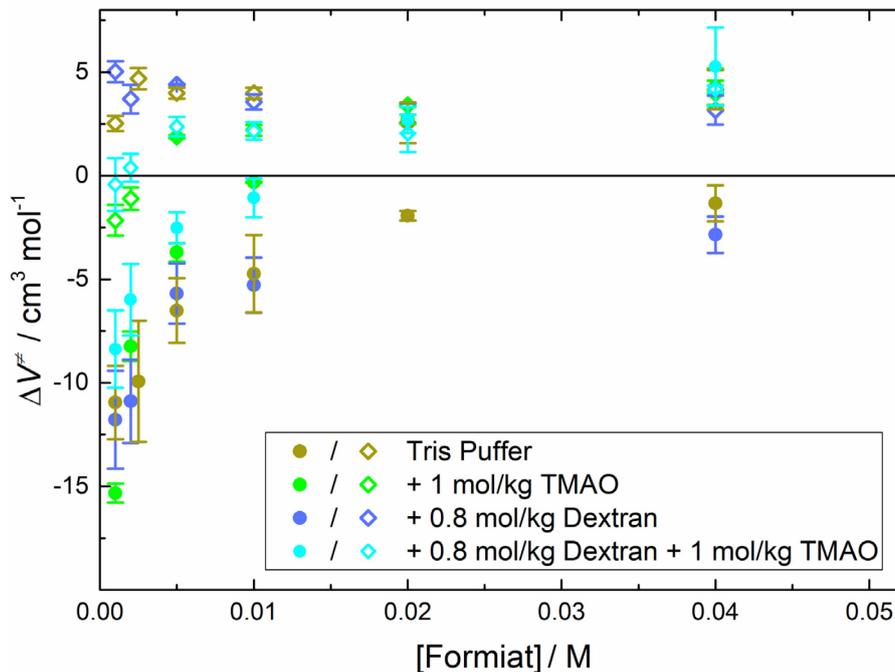


Abbildung i-10: Aktivierungsvolumen,  $\Delta V^\ddagger$ , in Abhängigkeit der Substratkonzentration,  $[\text{Formiat}]$ , für verschiedene Lösungsbedingungen.

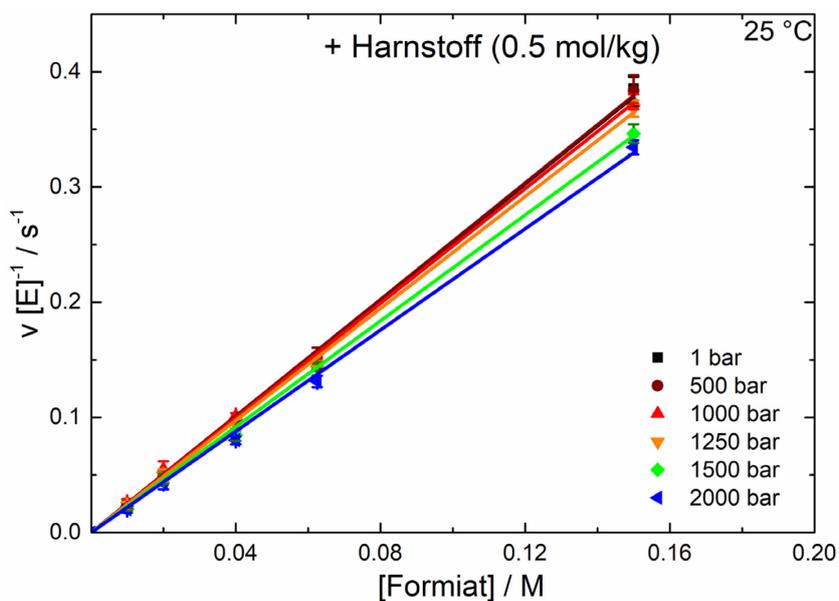


Abbildung i-11: Enzymaktivität von FDH in Anwesenheit von  $0.5 \text{ mol kg}^{-1}$  Harnstoff. Die Daten zeigen trotz der verwendeten höheren Substratkonzentrationen kein MICHAELIS-MENTEN-Verhalten.

## i.9 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
ArgBP	<i>Arginine binding protein</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CD-Spektroskopie	<i>Circular-Dichroism</i> -Spektroskopie
DAC	Diamantstempelzelle
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DS-Mix	<i>deep sea</i> -Gemisch
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ES <sup>‡</sup>	Übergangszustand des ES
FSD	<i>FOURIER-self deconvolution</i>
FTIR	FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie
$\Delta H^{\circ}_{\text{vH}}$	VAN'T HOFF-Enthalpie
HHP	hoher hydrostatischer Druck
HPSF	Hochdruck-Stopped-Flow
IR	Infrarotspektroskopie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$k_{\text{cat}}$	Wechselzahl
KCl	Kaliumchlorid
$k_{\text{eff}}$	katalytische Effizienz
$K_{\text{M}}$	MICHAELIS-Konstante
LB-Medium	<i>(lysogeny broth)</i> -Nährmedium
LiP-MS	<i>limited proteolysis and mass spectroscopy</i>
Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Magnesiumperchlorat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
MIR	Mittlerer Infrarot
XXII	

MD-Simulation	Molekular dynamik-Simulation
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanz-Spektroskopie
PC-SAFT	<i>Perturbed-chain statistical associating fluid theory</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
Phe	Phenylalanin
<i>p</i> NP	<i>p</i> -Nitrophenol
<i>p</i> NPA	<i>p</i> -Nitrophenylacetat
Pro	Prolin
$p_u$	Entfaltungsdruck
QM/MM-Simulation	Quantenmechanik/Molekularmechnik-Simulation
SAAPP <i>p</i> NA	<i>N</i> -Succinyl-L-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -Nitroanilid
SASA	<i>solvent accessible surface area</i>
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung
SBP	<i>Substrate binding protein</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP <i>p</i> NA	<i>N</i> -Succinyl-L-Phenylalanin- <i>p</i> -Nitroanilid
SS-Mix	<i>shrimp shallow</i> -Gemisch
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
$T_u$	Entfaltungstemperatur

## i.10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Zuordnung einiger relevanter IR-Banden von Proteinen und Peptiden in D <sub>2</sub> O. Wellenzahlen der Sekundärstrukturelemente sind als Richtwerte angegeben. <sup>[83,84]</sup> .....	26
Tabelle 8-1: Mittels PC-SAFT, bereitgestellt von CHRISTOPH HELD, ermittelte Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M^a$ ) und Aktivitätskoeffizient des jeweiligen Cosolutes ( $\gamma_s$ ) für die formiatabhängige FDH-Reaktion bei dem niedrigsten und höchsten untersuchten Drücken bei $T = 25$ °C. ....	105
Tabelle 8-2: Vergleich der kinetischen Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{eff}$ ) der FDH-Reaktion für beide Substrate bei allen Drücken in reinem Puffer ( $T = 25$ °C). ....	108
Tabelle i-1: Verwendete Chemikalien und Protein sowie deren Bezugsquellen. ....	I
Tabelle i-2: Verwendete Geräte und Materialien sowie deren Bezugsquellen. ....	III
Tabelle i-3: Berechnete kinetische Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), maximale Geschwindigkeit ( $v_{max}$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) der $\alpha$ -CT-Reaktion für alle Drücke und Osmolytgemische ( $T = 20$ °C). ....	IV
Tabelle i-4: Berechnete Aktivierungsvolumina, $\Delta V^\ddagger$ , der $\alpha$ -CT-Reaktion für die jeweilige Substratkonzentration bei verschiedenen Osmolytgemischen. ....	V
Tabelle i-5: Spektroskopisch bestimmte Entfaltungstemperaturen und VAN'T HOFF-Enthalpieänderungen von GroEL, GroES und dem GroEL-GroES-Komplex (Molverhältnis 1:2) in Ab- und Anwesenheit verschiedener Salze und Cosolventien bei Umgebungsdruck. Für GroES konnten zwei strukturelle Übergänge (mit 1, 2 gekennzeichnet) beobachtet werden. ....	VI
Tabelle i-6: Spektroskopisch bestimmte Entfaltungsdrücke und Volumenänderungen der partiellen Entfaltung von GroES in Ab- und Anwesenheit verschiedener Cosolventien bei 25 °C. ....	VI
Tabelle i-7: Vergleich aller Sekundärstrukturelemente in Prozent aller gemessenen ArgBP-Varianten bei 1 bar, 10 kbar und nach der Dekompression bei 25 °C. ....	IX
Tabelle i-8: Anteil der Sekundärstrukturelemente der ArgBP-Varianten anhand der PDB-Datenbank. ....	IX
Tabelle i-9: Entfaltungstemperaturen (Anzahl: 75) und Entfaltungsdrücke (Anzahl: 36) von Proteinen, soweit in der Literatur (Ref.) angegeben, unter Verwendung verschiedener Arten von Messmethoden. Hyper-/thermophile Proteine sind rot markiert, während mesophile Proteine schwarz gekennzeichnet sind. ....	XI

Tabelle i-10: Verwendete Entfaltungstemperaturen und -drücke von Proteinen, die für die Auftragung des Einschubs in Abbildung 6-4 verwendet worden sind..... XIII

Tabelle i-11: Berechnete kinetische Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M = k_{eff}$ )) der  $\alpha$ -CT-Reaktion für alle untersuchten Drücke und Salzlösungen bei  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ . ..... XIV

Tabelle i-12: Berechnete Aktivierungsvolumina für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SPpNA bei verschiedenen Salzlösungen ( $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ ). .....XV

Tabelle i-13: Berechnete Aktivierungsvolumina in Abhängigkeit der Substratkonzentration für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SPpNA bei verschiedenen Salzlösungen ( $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ ). .....XV

Tabelle i-14: Quantitative Schätzung der Sekundärstrukturanteile von  $\alpha$ -CT mittels FTIR im Vergleich zu Literaturdaten nach verschiedenen Methoden. ....XV

Tabelle i-15: Berechnete kinetische Parameter (MICHAELIS-Konstante ( $K_M$ ), Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M = k_{eff}$ )) der  $\alpha$ -CT-Reaktion für alle untersuchten Drücke und Messlösungen ( $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ). ..... XVI

Tabelle i-16: Berechnete Aktivierungsvolumina,  $\Delta V^\ddagger$ , für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SAAPPpNA bei verschiedenen Pufferlösungen ( $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ). .....XVII

## i.11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Vereinfachte Darstellung der Volumenänderung einer hypothetischen enzymatischen Reaktion, bei der der Enzym-Substrat-Komplex (ES) in das freie Enzym (E) und Produkt (P) umgewandelt wird. ....	7
Abbildung 1-2: Schematisch illustriertes Konzept des excluded volume Effekts. Die makromolekularen <i>Crowder</i> (hier als ungeordnete Strukturen in violett gezeichnet) nehmen im Zellinneren (blau) typischerweise ~ 30 Vol.-% des verfügbaren Gesamtvolumens ein.....	10
Abbildung 1-3: Allgemeines, schematisches Temperatur-Druck-Stabilitäts-Phasendiagramm unter Annahme eines Zweizustandsmodells für den Entfaltungsprozess eines Proteins mit den jeweiligen Vorzeichen der Entropie- und Volumenänderung (modifiziert aus Quelle <sup>[41]</sup> ). ....	13
Abbildung 1-4: Vereinfachte schematische Darstellung der Grenzen der Biosphäre auf der Erde, die mögliches Leben eingrenzen. ....	15
Abbildung 2-1: Wesentliche Komponenten des Hochdruck-Stopped-Flow-Instruments, modifiziert aus TgK Scientific (Benutzerhandbuch): .....	21
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Hochdruckzelle einer HPSF-Apparatur. ....	22
Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers mit anschließender FOURIER-Transformation, modifiziert nach Quelle <sup>[83]</sup> . ....	24
Abbildung 2-4: Schematische Querschnittsdarstellung der verwendeten IR-Zellen (links: temperierbare Messzelle und rechts Diacell® VivoDac-Zelle). ....	28
Abbildung 3-1: Zusammensetzung des shrimp shallow (SS)- und deep sea (DS) Osmolyt-Gemisches, die in den Garnelen in Meerestiefen von circa 500 Metern, beziehungsweise in der Tiefseeebene bei 2900 Metern vorkommen (modifiziert aus YANCEY <i>et al.</i> , 2002). <sup>[23]</sup> ....	31
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Reaktionsgleichung und gemessene zeitliche Änderung des Absorptionsspektrums während der Reaktion. ....	34
Abbildung 3-3: Auftragung der Konzentration des gebildeten Produktes in Abhängigkeit der Zeit, hier exemplarisch dargestellt für die Hydrolyse von SPpNA durch $\alpha$ -CT im SS-Mix bei 20 °C.....	35
Abbildung 3-4: MICHAELIS-MENTEN-Plots der enzymatischen Aktivität von $\alpha$ -CT bei verschiedenen Substratkonzentrationen, $c_{\text{Substrat}}$ , und Drücken. ....	36
Abbildung 3-5: Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter der von $\alpha$ -CT katalysierten Hydrolysereaktion von SPpNA in unterschiedlichen Puffer/Osmolyt-Lösungen.....	37
Abbildung 3-6: Auftragung des Aktivierungsvolumens, $\Delta V^\ddagger$ , in Abhängigkeit der Substratkonzentration für die fünf gemessenen Lösungen. ....	38

Abbildung 3-7: a) Schematische Darstellung des Volumenprofils einer enzymatischen Reaktion, wobei der Druck die Bildung des Produktes aufgrund eines negativen Aktivierungsvolumens bevorzugt. .... 40

Abbildung 4-1: Reaktionsgleichung der Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol und Essigsäure durch Ac-IHIHIQI-CONH<sub>2</sub>..... 47

Abbildung 4-2: Druckabhängige FTIR-Spektren der Amyloidfibrillen in der Amid-I'-(1520-1700 cm<sup>-1</sup>) und Alkan-(2850-3000 cm<sup>-1</sup>) Spektralregion (6 gew.-% AF, 25 °C, bis 10 kbar). 48

Abbildung 4-3: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme der enzymatischen Aktivität der Amyloidfibrillen bei verschiedenen Substratkonzentrationen und Drücken bei 22 °C. .... 49

Abbildung 4-4: Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter MICHAELIS-Konstante,  $K_M$ , katalytische Wechselzahl,  $k_{cat}$ , und katalytische Effizienz,  $k_{cat}/K_M$ , der AF-katalysierten Hydrolysereaktion von pNPA in verschiedenen Puffer-/Osmolytlösungen bei  $T = 22$  °C..... 50

Abbildung 4-5: Aktivierungsvolumen in Abhängigkeit der Substratkonzentration (pNPA) für alle Puffer-/Osmolytlösungen: Tris-Puffer ohne Osmolyt oder *Crowder* (grau), Puffer + 0.5 M TMAO (grün), Puffer + 1 M Harnstoff (rot) oder Puffer + 25 gew.-% Ficoll PM70 (blau). .. 51

Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des Volumenprofils der enzymatischen Reaktion (E = Enzym, S = Substrat, ES = Enzym-Substrat-Komplex, ES<sup>‡</sup> = Übergangszustand, P = Produkt), wobei der steigende Druck die Produktbildung begünstigt. .... 52

Abbildung 5-1: a) Sekundärstrukturdarstellung des GroEL-GroES-Komplexes (PDB: 3WVL), b) Schema des Reaktionszyklus des GroEL-GroES-Systems..... 56

Abbildung 5-2: a) SAXS-Intensitätskurven  $I(Q)$  und b) die Paarabstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  von GroEL (15 mg mL<sup>-1</sup>, schwarz), GroES (15 mg mL<sup>-1</sup>, blau) und dem GroEL-GroES-Komplex (Molverhältnis 1:2, in Gegenwart von 3 mM ATP, rot) in wässriger Lösung (50 mM Tris-Puffer, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7.5) bei Raumtemperatur ( $T \approx 25$  °C)..... 60

Abbildung 5-3: Temperaturabhängige FTIR-Absorptionsdaten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei Atmosphärendruck. .... 63

Abbildung 5-4: Druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei 25 °C..... 65

Abbildung 5-5: Spektroskopisch bestimmte Entfaltungstemperaturen,  $T_u$ , von GroEL, GroES und des gesamten Komplexes bei Atmosphärendruck in Ab- und Anwesenheit verschiedener Salzionen, Nukleotide und Cosolventien (urea = Harnstoff). .... 66

Abbildung 5-6: Spektroskopisch ermittelte Entfaltungsdrücke,  $p_u$ , und Volumenänderungen,  $\Delta V_u$ , von GroES bei 25 °C in Ab- und Anwesenheit von Cosolventien. .... 68

Abbildung 6-1: Strukturelle Darstellung der in der vorliegenden Studie charakterisierten ArgBP-Varianten.....	72
Abbildung 6-2: Druckinduzierte Änderungen der hintergrundkorrigierten und normierten Amid-I'-Bande aller untersuchten ArgBP-Varianten. ....	76
Abbildung 6-3: Druckabhängige Änderungen der FSD-Spektren für die verschiedenen Varianten von ArgBP in der Amid-I'-Banden- (1700-1600 $\text{cm}^{-1}$ ) und Amid-II'-Bandenregion (1575-1480 $\text{cm}^{-1}$ ) bei 25 °C.....	78
Abbildung 6-4: Häufigkeitsverteilung von A) Entfaltungstemperatur ( $T_u$ ) und B) -druck ( $p_u$ ) verschiedener aus der Literatur entnommener, untersuchter Proteine. ....	80
Abbildung 7-1: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme der enzymatischen Aktivität von $\alpha$ -CT bei $T = 20$ °C in verschiedenen Pufferlösungen bei den zwei ausgewählten Drücken von 1 bar und 2 kbar.....	85
Abbildung 7-2: a, c, e) Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter ( $K_M$ , $k_{cat}$ , und $k_{eff}$ ) der $\alpha$ -CT-katalysierten Hydrolysereaktion von SPpNA unter verschiedenen Salzbedingungen. ....	86
Abbildung 7-3: Normierte, temperaturabhängige FTIR-Spektren von $\alpha$ -CT (50 $\text{mg mL}^{-1}$ )....	88
Abbildung 7-4: Normierte, druckabhängige FTIR-Spektren von $\alpha$ -CT (50 $\text{mg mL}^{-1}$ ). ....	91
Abbildung 7-5: $p$ , $T$ -Stabilitätsphasendiagramm von $\alpha$ -CT (50 $\text{mg mL}^{-1}$ , + 10 mM $\text{CaCl}_2$ ) in Abhängigkeit verschiedener $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ -Konzentrationen. ....	93
Abbildung 8-1: a) Formiatdehydrogenase (PDB: 5DN9, + $\text{NAD}^+$ (blau))-Reaktion von $\text{NAD}^+$ und Formiat unter Bildung der Produkte $\text{CO}_2$ und $\text{NADH}$ . b) Schematische Darstellung eines Regenerationsprozesses von reduzierten Cofaktoren durch die FDH-katalysierte Reaktion. .	97
Abbildung 8-2: MICHAELIS-MENTEN-Plots der Enzymreaktion von FDH bei verschiedenen Substratkonzentrationen, [Formiat], und Drücken:.....	102
Abbildung 8-3: Druckabhängigkeit der kinetischen Parameter für die durch FDH katalysierte Redoxreaktion von $\text{NAD}^+$ und Formiat bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Lösungen ermittelt anhand der Änderung der Formiatkonzentration: .....	104
Abbildung 8-4: Vergleich zwischen den gemessenen $K_M$ (hellere Balken) bei 25 °C und den vorhergesagten MICHAELIS-Konstanten $K_M^a$ (dunklere Balken) mittels PC-SAFT <sup>[94,292]</sup> , bereitgestellt von CHRISTOPH HELD. ....	106
Abbildung 8-5: Druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von FDH in Tris-Puffer bei 25 °C.....	109
Abbildung 9-1: A) Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktion von $\alpha$ -CT (PDB: 1YPH; Substrat (dunkelgrau); Produkt (gelb) in Gegenwart von <i>Crowdern</i> (Dextran (türkis),	

PEG (purpur)) und Cosolventien (TMAO und Harnstoff). B) Katalytische Triade von  $\alpha$ -CT in Gegenwart des Substrats *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid..... 113

Abbildung 9-2: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme für die Hydrolyse von SAAPPpNA, katalysiert durch  $\alpha$ -CT, bei verschiedenen Substratkonzentrationen [S] und Drücken *p* bei *T* = 25 °C..... 117

Abbildung 9-3: Druckabhängigkeit der kinetischen Größen für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SAAPPpNA in verschiedenen Messlösungen bezüglich 10 gew.-% Dextran: ..... 119

Abbildung 9-4: Druckabhängigkeit der kinetischen Größen für die durch  $\alpha$ -CT katalysierte Hydrolyse von SAAPPpNA in verschiedenen Messlösungen bezüglich 10 gew.-% PEG:... 122

Abbildung i-1: SDS-Gel von GroEL (links) und GroES (rechts) vor (1) und nach der Aufreinigung mit den entsprechenden Pools (2-7). ..... VII

Abbildung i-2: Kurvenanpassungsergebnisse der temperaturabhängigen FTIR-Daten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei Umgebungsdruck: ..... VII

Abbildung i-3: Kurvenanpassungsergebnisse der druckabhängigen FTIR-Daten von GroEL und GroES in reinem Puffer bei 25 °C: ..... VIII

Abbildung i-4: Druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten des GroEL-GroES-Komplexes in reinem Puffer (Puffer B + 3 mM ATP und 10 mM MgCl<sub>2</sub>) bei 25 °C. .... VIII

Abbildung i-5: Entsprechende FSD-Spektren (B, D, F, H) und 2<sup>nd</sup> derivative Spektren (A, C, E, G) aller ArgBP-Varianten bei 25 °C, siehe Abbildung 6-2. .... X

Abbildung i-6: Normierte FTIR-Spektren von  $\alpha$ -CT (50 mg mL<sup>-1</sup>) für verschiedene Lösungsbedingungen (reiner Puffer: 100 mM Tris +10 mM CaCl<sub>2</sub>) bei Umgebungsdruck und bei 25 °C, sowie die entsprechenden Sekundärstrukturkomponenten. ....XVIII

Abbildung i-7: Druckabhängigkeit der kinetischen Größen (MICHAELIS-Konstante, Wechselzahl, katalytische Effizienz) der  $\alpha$ -CT-katalysierten Hydrolyse von SAAPPpNA in verschiedenen Lösungen. .... XIX

Abbildung i-8: Druckabhängigkeit der Aktivierungsenergie der FDH-Reaktion.....XX

Abbildung i-9: Aktivierungsvolumen,  $\Delta V^\ddagger$ , in Abhängigkeit der Substratkonzentration, [Formiat], bei verschiedenen Temperaturen. ....XX

Abbildung i-10: Aktivierungsvolumen,  $\Delta V^\ddagger$ , in Abhängigkeit der Substratkonzentration, [Formiat], für verschiedene Lösungsbedingungen..... XXI

Abbildung i-11: Enzymaktivität von FDH in Anwesenheit von 0.5 mol kg<sup>-1</sup> Harnstoff. .... XXI

## i.12 Literaturverzeichnis

- [1] P. K. Robinson, *Essays Biochem.* **2015**, *59*, 1–41.
- [2] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch Der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- [3] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, P. K. Mehta, *3 Biotech* **2016**, *6*, 1–15.
- [4] O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang, *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 345–351.
- [5] J. Chapman, A. E. Ismail, C. Z. Dinu, *Catalysts* **2018**, *8*, 1–26.
- [6] J. M. Choi, S. S. Han, H. S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443–1454.
- [7] V. I. Tishkov, V. O. Popov, *Biochem.* **2004**, *69*, 1537–1554.
- [8] V. O. Popov, V. S. Lamzin, *Biochem J.* **1994**, *301*, 625–643.
- [9] R. K. Yadav, J. O. Baeg, G. H. Oh, N. J. Park, K. J. Kong, J. Kim, D. W. Hwang, S. K. Biswas, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11455–11461.
- [10] H. Choe, J. C. Joo, D. H. Cho, M. H. Kim, S. H. Lee, K. D. Jung, Y. H. Kim, *PLoS One* **2014**, *9*, e103111.
- [11] V. I. Tishkov, V. O. Popov, *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 89–110.
- [12] R. Winter, J. Jonas, *High Pressure Chemistry, Biochemistry and Materials Science*, Springer, Dordrecht, **1993**.
- [13] E. Morild, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 93–166.
- [14] G. Weber, H. G. Drickamer, *Q. Rev. Biophys.* **1983**, *16*, 89–112.
- [15] G. Panick, H. Herberhold, Z. Sun, R. Winter, *Spectroscopy* **2003**, *17*, 367–376.
- [16] J. Rouget, T. Aksel, J. Roche, J. Saldana, A. Garcia, D. Barrick, C. Royer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6020–6027.
- [17] Q. Huang, K. N. Tran, J. M. Rodgers, D. H. Bartlett, R. J. Hemley, T. Ichiye, *Condens. Matter Phys.* **2016**, *19*, 1–16.
- [18] J. Silva, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1993**, *44*, 89–113.
- [19] M. J. Eisenmenger, J. I. Reyes-De-Corcuera, *Enzym. Microb. Technol.* **2009**, *45*, 331–347.
- [20] R. Jaenicke, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, *10*, 1–67.
- [21] A. B. Downing, G. T. Wallace, P. H. Yancey, *Deep. Res. Part I* **2018**, *138*, 1–10.
- [22] P. Yancey, J. Siebenaller, *J. Exp. Biol.* **2015**, *218*, 1880–1896.
- [23] P. Yancey, W. Blake, J. Conley, *Comp. Biochem. A* **2002**, *133*, 667–676.
- [24] P. H. Yancey, M. D. Rhea, K. M. Kemp, D. M. Bailey, *Cell. Mol. Biol.* **2004**, *50*, 371–376.
- [25] D. Canchi, P. Jayasimha, D. Rao, G. Makhatadze, A. Garcia, *Biophys. J.* **2013**, *104*, 12095–12104.
- [26] B. Bennion, V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 6433–6438.
- [27] T. Vöpel, G. I. Makhatadze, *PLoS One* **2012**, *7*, 1–6.
- [28] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 597–604.
- [29] S. K. Mukherjee, S. Biswas, H. Rastogi, A. Dawn, P. K. Chowdhury, *Eur. Biophys. J.* **2020**, *49*, 289–305.
- [30] W. M. Aumiller, B. W. Davis, E. Hatzakis, C. D. Keating, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10624–10632.
- [31] H.-X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.
- [32] G. Rivas, A. P. Minton, *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 970–981.
- [33] A. P. Minton, J. Wilf, *Biochemistry* **1981**, *20*, 4821–4826.
- [34] D. Gnutt, S. Ebbinghaus, *Biol. Chem.* **2016**, *397*, 37–44.
- [35] W. B. Monteith, G. J. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 11335–11340.
- [36] N. A. Chebotareva, B. I. Kurganov, N. B. Livanova, *Biochem.* **2004**, *69*, 1239–1251.
- [37] J. Seeliger, A. Werkmüller, R. Winter, *PLoS One* **2013**, *8*, e69652.
- [38] K. Luby-Phelps, P. E. Castle, D. L. Taylor, F. Lanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 4910–4913.
- [39] S. Mukherjee, M. M. Waegele, P. Chowdhury, L. Guo, F. Gai, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 227–236.
- [40] A. Totosaus, J. Montejano, J. Salazar, I. Guerrero, *Int. J. Food Sci. Tech.* **2002**, *37*, 589–601.
- [41] D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, R. Winter, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2007**, *32*, 41–97.
- [42] J. Roche, C. A. Royer, *J. R. Soc. Interface* **2018**, *15*: 201802.
- [43] M. Boob, Y. Wang, M. Gruebele, *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 8341–8350.

- [44] D. Balchin, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, *Science* **2016**, 353, aac4354-1–12.
- [45] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 858–875.
- [46] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Rev. Miner. Geochem.* **2013**, 75, 607–648.
- [47] O. Carny, E. Gazit, *FASEB J.* **2005**, 19, 1051–1055.
- [48] W. B. Hamilton, *Earth-Science Rev.* **2019**, 198, 102905.
- [49] K. Altwegg, H. Balsiger, A. Bar-Nun, J. J. Berthelier, A. Bieler, P. Bochslers, C. Briois, U. Calmonte, M. R. Combi, H. Cottin, et al., *Sci. Adv.* **2016**, 2, e1600285.
- [50] S. L. Miller, *Science* **1953**, 117, 528–529.
- [51] M. P. Friedmann, R. Riek, A. Sobol, V. Torbeev, J. Greenwald, V. Zelenay, *PLoS One* **2015**, 10, e0143948-1–16.
- [52] D. W. Deamer, G. R. Fleischaker, *Origins of Life: The Central Concepts*, Jones And Bartlett Publishers International, London, **1993**.
- [53] M. L. Romero Romero, A. Rabin, D. S. Tawfik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 15966–15971.
- [54] R. N. Rambaran, L. C. Serpell, *Prion* **2008**, 2, 112–117.
- [55] T. Q. Luong, N. Erwin, M. Neumann, A. Schmidt, C. Loos, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 12412–12416.
- [56] A. Lazcano, J. Fastag, P. Gariglio, C. Ramírez, J. Oró, *J. Mol. Evol.* **1988**, 27, 365–376.
- [57] C. M. Rufo, Y. S. Moroz, O. V. Moroz, J. Stöhr, T. A. Smith, X. Hu, W. F. DeGrado, I. V. Korendovych, *Nat. Chem.* **2014**, 6, 303–309.
- [58] J. Greenwald, M. P. Friedmann, R. Riek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 11609–11613.
- [59] J. Greenwald, R. Riek, *Structure* **2010**, 18, 1244–1260.
- [60] J. P. Harrison, N. Gheeraert, D. Tsigelnitskiy, C. S. Cockell, *Trends Microbiol.* **2013**, 21, 204–212.
- [61] C. S. Cockell, *Astrobiology: Understanding Life in the Universe*, Wiley-Blackwell, **2015**.
- [62] F. Canganella, J. Wiegel, *Naturwissenschaften* **2011**, 98, 253–279.
- [63] A. Diez, *Science* **2018**, 361, 448–449.
- [64] R. Orosei, S. E. Lauro, E. Pettinelli, A. Cicchetti, M. Coradini, B. Cosciotti, F. Di Paolo, E. Flamini, E. Mattei, M. Pajola, et al., *Science* **2018**, 361, 490–493.
- [65] V. J. Laye, S. Dassarma, *Astrobiology* **2018**, 18, 412–418.
- [66] H. Cottin, J. M. Kotler, K. Bartik, H. J. Cleaves, C. S. Cockell, J. P. P. de Vera, P. Ehrenfreund, S. Leuko, I. L. Ten Kate, Z. Martins, et al., *Sp. Sci. Rev.* **2017**, 209, 1–42.
- [67] J. C. Castillo-Rogez, M. Neveu, J. E. C. Scully, C. H. House, L. C. Quick, A. Bouquet, K. Miller, M. Bland, M. C. De Sanctis, A. Ermakov, et al., *Astrobiology* **2020**, 20, 269–291.
- [68] F. Raulin, C. Brassé, O. Poch, P. Coll, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 5380–5393.
- [69] H. W. Hsu, F. Postberg, Y. Sekine, T. Shibuya, S. Kempf, M. Horányi, A. Juhász, N. Altobelli, K. Suzuki, Y. Masaki, et al., *Nature* **2015**, 519, 207–210.
- [70] R. S. Taubner, P. Pappenreiter, J. Zwicker, D. Smrzka, C. Pruckner, P. Kolar, S. Bernacchi, A. H. Seifert, A. Krajete, W. Bach, et al., *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1–11.
- [71] N. Khawaja, F. Postberg, J. Hillier, F. Klenner, S. Kempf, L. Nölle, R. Reviol, Z. Zou, R. Srama, *MNRAS* **2019**, 489, 5231–5243.
- [72] M. Mayor, D. Queloz, *Nature* **1995**, 378, 355–359.
- [73] J. N. Winn, D. C. Fabrycky, *Ann. Rev. Astron. Astrophys.* **2015**, 53, 409–447.
- [74] A. L. Shields, *Astrophys. J. Suppl. S.* **2019**, 243, 1–11.
- [75] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochem. Zeitung* **1913**, 49, 333–369.
- [76] G. E. Briggs, J. B. S. Haldane, *Biophys. J.* **1925**, 19, 338–339.
- [77] A. Ault, *J. Chem. Educ.* **1974**, 51, 381–386.
- [78] H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 658–666.
- [79] V. Schuabb, R. Winter, C. Czeslik, *Biophys. Chem.* **2016**, 218, 1–6.
- [80] B. B. Boonyaratanakornkit, C. B. Park, D. S. Clark, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1595, 235–249.
- [81] P. Butz, K. O. Greulich, H. Ludwig, *Biochemistry* **1988**, 27, 1556–1563.
- [82] P. Bugnon, G. Laurency, Y. Ducommun, P. Sauvageat, A. Merbach, R. Ith, R. Tschanz, M. Doludda, R. Bergbauer, E. Grell, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3045–3049.

- [83] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, Viewig+Deubner, **2011**.
- [84] D. M. Byler, H. Susi, *Biopolymers* **1986**, *25*, 469–487.
- [85] P. B. Tooke, *Trends Anal. Chem.* **1988**, *7*, 130–136.
- [86] D. J. Moffatt, H. H. Mantsch, *Method. Enzym.* **1992**, *210*, 192–200.
- [87] J. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F. Goñi, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1993**, *59*, 23–56.
- [88] B. Stuart, *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, ACOL, **1997**.
- [89] S. J. Prestrelski, D. M. Byler, M. N. Liebman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 133–143.
- [90] M. Carbonaro, A. Nucara, *Amino Acids* **2010**, *38*, 679–690.
- [91] P. Wong, D. Moffat, *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 1279–1281.
- [92] G. Panick, R. Winter, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1862–1869.
- [93] P. W. Hochachka, G. N. Somero, *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*, Oxford University Press, **2002**.
- [94] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 2951–2972.
- [95] R. H. Kelly, P. H. Yancey, *Biol. Bull.* **1999**, *196*, 18–25.
- [96] L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 11–29.
- [97] K. Akasaka, H. Matsuki, *High Pressure Bioscience*, Springer Heidelberg, **2015**.
- [98] T. Q. Luong, S. Kapoor, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 3555–3571.
- [99] D. N. Dubins, A. Lee, R. B. Macgregor, T. V. Chalikian, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9254–9259.
- [100] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 201–209.
- [101] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Erlkamp, H. Waldmann, R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 460–465.
- [102] R. Mishra, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6518–6521.
- [103] F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 346–354.
- [104] S. Imoto, P. Kibies, C. Rosin, R. Winter, S. M. Kast, D. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9534–9538.
- [105] C. R. Chen, G. I. Makhatadze, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14561–14570.
- [106] M. T. Lerch, Z. Yang, E. K. Brooks, W. L. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *18*, E1201–E1210.
- [107] J. L. Silva, A. C. Oliveira, T. C. R. G. Vieira, G. A. P. de Oliveira, M. C. Suarez, D. Foguel, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 7239–7267.
- [108] K. Akasaka, H. Nagahata, A. Maeno, K. Sasaki, *Biophysics (Oxf)*. **2008**, *4*, 29–32.
- [109] V. V. Mozhaev, R. Lange, E. V. Kudryashova, C. Balny, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52*, 320–331.
- [110] C. Schuabb, N. Kumar, S. Patariaia, D. Marx, R. Winter, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14661–14670.
- [111] S. Suladze, S. Cinar, B. Sperlich, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 12588–12596.
- [112] E. Decaneto, S. Suladze, C. Rosin, M. Havenith, W. Lubitz, R. Winter, *Biophys. J.* **2015**, *109*, 2371–2381.
- [113] T. Arakawa, S. Timasheff, *J. Biol. Chem.* **1985**, *47*, 411–414.
- [114] D. Canchi, A. García, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64*, 273–294.
- [115] W. Ma, C. Tang, L. Lai, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1183–1193.
- [116] A. S. Malinin, A. A. Rakhnyanskaya, A. V. Bacheva, A. A. Yaroslavov, *Polym. Sci. Ser. A* **2011**, *53*, 52–56.
- [117] M. Gross, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 617–630.
- [118] V. Schuabb, C. Czeslik, *Langmuir* **2014**, *30*, 15496–15503.
- [119] P. Bruzdziak, A. Panuszko, J. Stangret, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11502–11508.
- [120] T. O. Street, D. W. Bolen, G. D. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13997–14002.
- [121] L. M. Samuelsson, J. J. Bedford, R. A. J. Smith, J. P. Leader, *Comp. Biochem. A* **2005**, *141*, 22–28.
- [122] A. Kumar, P. Venkatesu, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4283–4307.
- [123] S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9721–9726.
- [124] D. W. Bolen, I. V. Baskakov, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 955–963.

- [125] T. Tretyakova, M. Shushanyan, T. Partskhaladze, M. Makharadze, R. Van Eldik, D. E. Khoshitariya, *Biophys. Chem.* **2013**, 175–176, 17–27.
- [126] R. C. Neuman, W. Kauzmann, A. Zipp, *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 2687–2691.
- [127] B. Krajewska, R. Van Eldik, M. Brindell, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, 17, 1123–1134.
- [128] C. Rosin, K. Estel, J. Hälker, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, 16, 1379–1385.
- [129] N. Spreti, P. di Profio, L. Marte, S. Bufali, L. Brinchi, G. Savelli, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 6491–6497.
- [130] T. Q. Luong, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 23273–23278.
- [131] N. Spreti, M. V. Mancini, R. Germani, P. Di Profio, G. Savelli, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2008**, 50, 1–6.
- [132] P. Attri, P. Venkatesu, M. J. Lee, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 1471–1478.
- [133] Y. Taniguchi, K. Suzuki, *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 5185–5193.
- [134] M. E. Gerringer, J. C. Drazen, P. H. Yancey, *Deep. Res. Part I* **2017**, 125, 135–146.
- [135] B. Chen, R. Hoffmann, R. Cammi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 11126–11142.
- [136] L. Platts, R. J. Falconer, *Int. J. Pharm.* **2015**, 486, 131–135.
- [137] V. Vathipadiekal, A. Verma, M. Rao, *Biol. Chem.* **2007**, 388, 61–65.
- [138] S. M. Gopal, F. Klumpers, C. Herrmann, L. V. Schäfer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 10753–10766.
- [139] S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 14230–14237.
- [140] A. Ganguly, T. Q. Luong, O. Brylski, M. Dirkmann, D. Möller, S. Ebbinghaus, F. Schulz, R. Winter, E. Sanchez-Garcia, W. Thiel, *J. Phys. Chem. B* **2017**, 121, 6390–6398.
- [141] F. Chiti, C. M. Dobson, *Ann. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333–366.
- [142] A. Ramamoorthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 8867.
- [143] A. Mukherjee, D. Moarles-Scheihing, P. C. Butler, C. Soto, *Trends Mol. Med.* **2015**, 21, 443–449.
- [144] J. Seeliger, F. Evers, C. Jeworrek, S. Kapoor, K. Weise, E. Andreetto, M. Tolan, A. Kapurniotu, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 679–683.
- [145] A. Gustot, J.-M. Ruyschaert, J. I. Gallea, M. S. Celej, R. Sarroukh, V. Raussens, *Biophys. J.* **2015**, 471, 323–333.
- [146] M. Gao, K. Estel, J. Seeliger, R. P. Friedrich, S. Dogan, E. E. Wanker, R. Winter, S. Ebbinghaus, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 8338–8348.
- [147] J. C. Rochet, P. T. Lansbury, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 60–68.
- [148] M. Sunde, C. Blake, *Adv. Protein Chem.* **1997**, 50, 123–159.
- [149] I. J. Morten, W. S. Gosal, S. E. Radford, E. W. Hewitt, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 29691–29700.
- [150] A. Arora, C. Ha, C. B. Park, *Protein Sci.* **2004**, 13, 2429–2436.
- [151] M. D. R. Peralta, A. Karsai, A. Ngo, C. Sierra, K. T. Fong, N. R. Hayre, N. Mirzaee, K. M. Ravikumar, A. J. Kluber, X. Chen, et al., *ACS Nano* **2015**, 9, 449–463.
- [152] A. Y. Chen, Z. Deng, A. N. Billings, U. O. S. Seker, M. Y. Lu, R. J. Citorik, B. Zakeri, T. K. Lu, *Nat. Mater.* **2014**, 13, 515–523.
- [153] T. P. J. Knowles, M. J. Buehler, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 469–479.
- [154] E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1263–1269.
- [155] T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.-M. Lin, H. Jaeger, S. L. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 4527–4532.
- [156] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, 300, 625–627.
- [157] S. Barrau, W. Mammo, M. R. Andersson, A. Herland, O. Inganäs, F. Zhang, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 023307-1–4.
- [158] S. Bolisetty, R. Mezzenga, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, 11, 365–371.
- [159] S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 5355–5360.
- [160] C. J. Forman, S. P. Jarvis, U. Feber, G. Kaggwa, A. A. Nickson, S. J. Anthony-Cahill, K. Sheikh, A. J. Baldwin, P. D. Barker, *ACS Nano* **2012**, 6, 1332–1346.
- [161] S. T. Kumar, J. Meinhardt, A. K. Fuchs, T. Aumüller, J. Leppert, B. Büchele, U. Knüpfer, R. Ramachandran, J. Kant Yadav, E. Prell, et al., *ACS Nano* **2014**, 8, 11042–11052.

- [162] Y. Fukushima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 2269–2274.
- [163] Y. M. Wong, H. Masunaga, J. A. Chuah, K. Sudesh, K. Numata, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3375–3385.
- [164] O. Monasterio, E. Nova, R. Diaz-Espinoza, *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **2017**, *482*, 1194–1200.
- [165] O. V. Makhlynets, P. M. Gosavi, I. V. Korendovych, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9017–9020.
- [166] X. M. Zhou, A. Entwistle, H. Zhang, A. P. Jackson, T. O. Mason, U. Shimanovich, T. P. J. Knowles, A. T. Smith, E. B. Sawyer, S. Perrett, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1961–1968.
- [167] Z. S. Al-Garawi, B. A. McIntosh, D. Neill-Hall, A. A. Hatimy, S. M. Sweet, M. C. Bagley, L. C. Serpell, *Nanoscale* **2017**, *9*, 10773–10783.
- [168] M. W. Jaworek, V. Schuabb, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *20*, 1347–1354.
- [169] P. Venkatesu, M.-J. Lee, H. -m. Lin, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5327–5338.
- [170] T. Arakawa, S. Timasheff, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5924–5929.
- [171] A. P. Minton, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10577–10581.
- [172] I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, V. N. Uversky, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 23090–23140.
- [173] A. Barth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *74*, 141–173.
- [174] J. Roche, J. A. Caro, D. N. Norberto, P. B. Barthe, C. R. Roumestand, J. L. Schlessmand, A. E. Garcia, B. García-Moreno, C. A. Royer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 6945–6950.
- [175] T. Q. Luong, N. Erwin, M. Neumann, A. Schmidt, C. Loos, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12412–12416.
- [176] C. Czeslik, T. Q. Luong, R. Winter, *MRS Bull.* **2017**, *42*, 738–742.
- [177] J. S. Kim, A. Yethiraj, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1333–1340.
- [178] G.-N. Wei, Q.-L. Zou, *Asian J. Chem.* **2012**, *24*, 3917–3922.
- [179] F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, *Sci. Compass* **2002**, *295*, 1852–1858.
- [180] A. Cario, M. Jebbar, A. Thiel, N. Kervarec, P. M. Oger, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–8.
- [181] F. U. Hartl, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, *Nature* **2011**, *475*, 324–332.
- [182] A. J. Gupta, S. Haldar, G. Miličić, F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2739–2754.
- [183] S. Sharma, K. Chakraborty, B. K. Müller, N. Astola, Y. C. Tang, D. C. Lamb, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, *Cell* **2008**, *133*, 142–153.
- [184] H. Taguchi, *J. Biochem.* **2005**, *137*, 543–549.
- [185] W. A. Fenton, A. L. Horwich, *Q. Rev. Biophys.* **2003**, *36*, 229–256.
- [186] D. Thirumalai, G. H. Lorimer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 245–269.
- [187] A. Marx, E. Mandelkow, *Eur. Biophys. J.* **1994**, *22*, 405–421.
- [188] A. K. Surin, N. V. Kotova, I. A. Kashparov, V. V. Marchenkov, S. Y. Marchenkova, G. V. Semisotnov, *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 260–262.
- [189] B. Sot, S. Bañuelos, J. M. Valpuesta, A. Muga, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32083–32090.
- [190] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Rev. Miner. Geochem.* **2013**, *75*, 607–648.
- [191] B. Orcutt, I. Daniel, Eds., R. Dasgupta, *Deep Carbon: Past to Present*, Cambridge University Press, **2019**.
- [192] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11413–11416.
- [193] K. Julius, J. Weine, M. Berghaus, N. König, M. Gao, J. Latarius, M. Paulus, M. A. Schroer, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2018**, *121*, 038101–1–6.
- [194] T. J. Welch, A. Farewell, F. C. Neighardt, D. H. Bartlett, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7170–7177.
- [195] M. Panda, P. M. Horowitz, *Biochemistry* **2002**, *41*, 1869–1876.
- [196] M. Panda, J. Ybarra, P. M. Horowitz, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12843–12849.
- [197] M. Panda, J. Ybarra, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6253–6259.
- [198] N. A. Ryabova, V. V. Marchenkov, S. Y. Marchenkova, N. V. Kotova, G. V. Semisotnov, *Biochem.* **2013**, *78*, 1405–1414.
- [199] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, R. Winter, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2809–2815.

- [200] C. Krywka, M. Paulus, C. Sternemann, M. Volmer, A. Remhof, G. Nowak, A. Nefedov, B. Pöter, M. Spiegel, M. Tolan, *J. Synchrotron Rad.* **2006**, *13*, 8–13.
- [201] R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 160–184.
- [202] M. Sztucki, T. Narayanan, *J. Appl. Cryst.* **2007**, *40*, 459–462.
- [203] D. Franke, M. V. Petoukhov, P. V. Konarev, A. Panjkovich, A. Tuukkanen, H. D. T. Mertens, A. G. Kikhney, N. R. Hajizadeh, J. M. Franklin, C. M. Jeffries, et al., *J. Appl. Cryst.* **2017**, *50*, 1212–1225.
- [204] T. Inobe, K. Takahashi, K. Maki, S. Enoki, K. Kamagata, A. Kadooka, M. Arai, K. Kuwajima, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1392–1402.
- [205] J. Chen, H. Yagi, Y. Furutani, T. Nakamura, A. Inaguma, H. Guo, Y. Kong, Y. Goto, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–7.
- [206] K. Braig, Z. Otwinowski, R. Hedge, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich, P. B. Sigler, *Nature* **1994**, *371*, 578–586.
- [207] J. Martin, A. L. Horwich, F. U. Hartl, *Science* **1992**, *258*, 995–998.
- [208] A. Valencia, T. J. Hubbard, A. Muga, S. Banuelos, O. Llorca, J. L. Carrascosa, J. M. Valpuesta, *Proteins* **1995**, *22*, 199–209.
- [209] O. Boudker, M. J. Todd, E. Freire, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 770–779.
- [210] R. Winter, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2019**, *48*, 441–463.
- [211] G. S. Jackson, R. A. Staniforth, D. J. Halsall, T. Atkinson, J. J. Holbrook, A. R. Clarke, S. G. Burston, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2554–2563.
- [212] P. V. Viitanen, T. H. Lubben, J. Reed, P. Goloubinoff, D. P. O’Keefe, G. H. Lorimer, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5565–5571.
- [213] A. Galán, O. Llorca, J. M. Valpuesta, J. Pérez-Pérez, J. L. Carrascosa, M. Menéndez, S. Bañuelos, A. Muga, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 347–355.
- [214] Q. Zhang, J. Chen, K. Kuwajima, H. M. Zhang, F. Xian, N. L. Young, A. G. Marshall, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1247–1253.
- [215] C. Pace, D. Laurents, J. Thomson, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2564–2572.
- [216] Q. Zou, S. Habermann-Rottinghaus, K. Murphy, *Proteins* **1998**, *31*, 107–115.
- [217] B. L. De Groot, G. Vriend, H. J. C. Berendsen, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 1241–1249.
- [218] A. M. Roseman, S. Chen, H. White, K. Braig, H. R. Saibil, *Cell* **1996**, *87*, 241–251.
- [219] J. P. Grason, J. S. Gresham, L. Widjaja, S. C. Wehri, G. H. Lorimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 17334–17338.
- [220] J. Wang, D. C. Boisvert, *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 843–855.
- [221] S. Meena, A. K. Saxena, *J. Phys. Chem. Biophys.* **2016**, *6*, 1–6.
- [222] L. Arns, V. Schuabb, S. Meichsner, M. Berghaus, R. Winter, *Z. Phys. Chem.* **2018**, *232*, 615–634.
- [223] P. H. Schummel, M. W. Jaworek, C. Rosin, J. Högg, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 28400–28411.
- [224] E. Petrov, P. R. Rohde, B. Cornell, B. Martinac, *Channels* **2012**, *6*, 262–271.
- [225] A. A. Brindley, R. W. Pickersgill, J. C. Partridge, D. J. Dunstan, D. M. Hunt, M. J. Warren, *PLoS One* **2008**, *3*, e2042.
- [226] D. H. Bartlett, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 367–381.
- [227] B. Gorovits, C. S. Raman, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2061–2066.
- [228] K. Hashimoto, A. R. Panchenko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 20352–20357.
- [229] M. H. Ali, B. Imperiali, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5013–5020.
- [230] Y. Liu, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1285–1299.
- [231] R. P.-A. Berntsson, S. H. J. Smits, L. Schmitt, D. J. Slotboom, B. Poolman, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2606–2617.
- [232] M. S. Luchansky, B. S. Der, S. D’Auria, G. Pocsfalvi, L. Iozzino, D. Marasco, J. D. Dattelbaum, *Mol. Biosyst.* **2009**, *6*, 142–151.
- [233] A. Ruggiero, J. D. Dattelbaum, M. Staiano, R. Berisio, S. D’Auria, L. Vitagliano, *PLoS One* **2014**, *9*, 1–11.
- [234] A. Ruggiero, J. D. Dattelbaum, A. Pennacchio, L. Iozzino, M. Staiano, M. S. Luchansky, B. S. Der, R. Berisio, S. Dauria, L. Vitagliano, *Acta Cryst. Sect. F Struc. Biol. Cryst. Commun.* **2011**,

- 67, 1462–1465.
- [235] G. Smaldone, R. Berisio, N. Balasco, S. D’Auria, L. Vitagliano, A. Ruggiero, *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, 1866, 952–962.
- [236] G. Smaldone, N. Balasco, M. Vigorita, A. Ruggiero, S. Cozzolino, R. Berisio, P. del Vecchio, G. Graziano, L. Vitagliano, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 119, 758–769.
- [237] G. Smaldone, A. Ruggiero, N. Balasco, A. Abuhammad, I. Autiero, D. Caruso, D. Esposito, G. Ferraro, E. L. M. Gelardi, M. Moreira, et al., *Acta Cryst. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2019**, 75, 707–713.
- [238] G. Smaldone, M. Vigorita, A. Ruggiero, N. Balasco, J. D. Dattelbaum, S. D’Auria, P. Del Vecchio, G. Graziano, L. Vitagliano, *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, 1864, 814–824.
- [239] N. Balasco, G. Smaldone, M. Vigorita, P. Del Vecchio, G. Graziano, A. Ruggiero, L. Vitagliano, *Sci. Rep.* **2019**, 9, 6617.
- [240] N. Balasco, G. Smaldone, A. Ruggiero, A. De Simone, L. Vitagliano, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 118 (B), 1924–1930.
- [241] K. Heremans, L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1386, 353–370.
- [242] W. Dzwolak, M. Kato, Y. Taniguchi, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1595, 131–144.
- [243] H. Bönisch, J. Backmann, T. Kath, D. Naumann, G. Schafer, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 333, 75–84.
- [244] A. Pica, G. Graziano, *Biopolymers* **2016**, 105, 856–863.
- [245] P. Leuenberger, S. Ganscha, A. Kahraman, V. Cappelletti, P. J. Boersema, C. Von Mering, M. Claassen, P. Picotti, *Science* **2017**, 355, eaai7825-1–12.
- [246] E. Mombelli, E. Shehi, P. Fusi, P. Tortora, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1595, 392–396.
- [247] M. Chaplin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 861–866.
- [248] S. M. Clifford, J. Lasue, E. Heggy, J. Boisson, P. McGovern, M. D. Max, *J. Geophys. Res.* **2010**, 115, 1–17.
- [249] N. Merino, H. S. Aronson, D. P. Bojanova, J. Feyhl-Buska, M. L. Wong, S. Zhang, D. Giovannelli, *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 1–25.
- [250] M. H. Hecht, S. P. Kounaves, R. C. Quinn, S. J. West, S. M. M. Young, D. W. Ming, D. C. Catling, B. C. Clark, W. V. Boynton, J. Hoffman, et al., *Science* **2009**, 235, 64–67.
- [251] A. H. Stevens, D. Childers, M. Fox-Powell, N. Nicholson, E. Jhoti, C. S. Cockell, *Astrobiology* **2019**, 19, 87–98.
- [252] A. Gendrin, N. Mangold, J. P. Bibring, Y. Langevin, B. Gondet, F. Poulet, G. Bonello, C. Quantin, J. Mustard, R. Arvidson, et al., *Science* **2005**, 307, 1587–1591.
- [253] J. C. Warren, S. G. Cheatam, *Biochemistry* **1966**, 5, 1702–1707.
- [254] S. Cozzolino, R. Oliva, G. Graziano, P. Del Vecchio, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20, 29389–29398.
- [255] E. Dušeková, K. Garajová, R. Yavaşer, R. Varhač, E. Sedlák, *Biophys. Chem.* **2018**, 243, 8–16.
- [256] M. Knierbein, A. Wangler, T. Q. Luong, R. Winter, C. Held, G. Sadowski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, 21, 22224–22229.
- [257] L. M. Pegram, M. T. J. Record, *Chem. Phys. Lett.* **2008**, 467, 1–8.
- [258] C. Held, G. Sadowski, *Fluid Phase Equilib.* **2009**, 279, 141–148.
- [259] F. Meersman, C. Dirix, S. Shipovskov, N. L. Klyachko, K. Heremans, *Langmuir* **2005**, 21, 3599–3604.
- [260] M. Levitt, J. Greer, *J. Mol. Biol.* **1977**, 114, 181–293.
- [261] S. A. Hawley, *Biochemistry* **1971**, 10, 2436–2442.
- [262] Z. Sun, R. Winter, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Berlin, **2002**.
- [263] K. Kar, B. Alex, N. Kishore, *J. Chem. Thermodyn.* **2002**, 34, 319–336.
- [264] F. C. Wu, M. Laskowski, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, 19, 110–115.
- [265] J. W. Bye, R. J. Falconer, *Protein Sci.* **2013**, 22, 1563–1570.
- [266] E. Lee, J. H. Choi, M. Cho, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 20008–20015.
- [267] S. Lenton, N. H. Rhys, J. J. Towey, A. K. Soper, L. Dougan, *Nat. Commun.* **2017**, 8, 1–5.
- [268] S. A. Hawley, R. M. Macleod, *Biopolymers* **1974**, 13, 1417–1426.
- [269] R. Winter, J. Erbes, C. Czeslik, A. Gabke, *J. Phys. Condens. Matter* **1998**, 10, 11499–11518.
- [270] J. Z. Kaye, J. A. Baross, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 6220–6229.

- [271] S. E. Lauro, E. Pettinelli, G. Caprarelli, L. Guallini, A. Pio Rossi, E. Mattei, A. Cicchetti, B. Cosciotti, F. Di Paolo, F. Soldovieri, et al., *Nat. Astron.* **2020**, <https://doi.org/10.1038/s41550-020-1200-6>.
- [272] J. Heinz, J. Schirmack, A. Airo, S. P. Kounaves, D. Schulze-Makuch, *Astrobiology* **2018**, *18*, 1171–1180.
- [273] K. Schirwitz, A. Schmidt, V. S. Lamzin, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 1146–1156.
- [274] M. Guo, Y. Xu, M. Gruebele, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 17863–7.
- [275] M. Reichert, M. Haumann, R. Buchholz, C. Lindenberger, *Int J. Engin. Sci.* **2016**, *6*, 25–35.
- [276] E. B. Ordu, G. Cameron, A. R. Clarke, N. G. Karagüler, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2887–2892.
- [277] R. Castillo, M. Oliva, S. Martí, V. Moliner, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10012–10022.
- [278] J. Zheng, T. Yang, J. Zhou, M. Xu, X. Zhang, Z. Rao, *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e02624-16.
- [279] H. Slusarczyk, S. Felber, M. R. Kula, M. Pohl, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1280–1289.
- [280] P. Yancey, G. Somero, *J. Exp. Zool.* **1980**, *212*, 205–213.
- [281] P. Yancey, M. Clark, S. Hand, R. Bowlus, G. Somero, *Science* **1982**, *217*, 1214–1222.
- [282] S. Piszkiwicz, G. J. Pielak, *Biochemistry* **2019**, *58*, 3825–3833.
- [283] T. Schmidt, C. Michalik, M. Zavrel, A. Spieß, W. Marquardt, M. B. Ansorge-Schumacher, *Biotech. Prog.* **2010**, *26*, 73–78.
- [284] B. F. Erlanger, F. Edel, A. G. Cooper, *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *115*, 206–210.
- [285] Y. Kawai, T. Matsuo, A. Ohno, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, *2*, 887–891.
- [286] A. Wangler, R. Canales, C. Held, T. Q. Luong, R. Winter, D. H. Zaitsau, S. P. Verevkin, G. Sadowski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 11317–11326.
- [287] P. H. Schummel, M. Gao, R. Winter, *ChemPhysChem* **2016**, 189–197.
- [288] T. Mashino, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *258*, 356–360.
- [289] C. Balcells, I. Pastor, E. Vilaseca, S. Madurga, M. Cascante, F. Mas, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4062–4068.
- [290] I. Pastor, E. Vilaseca, S. Madurga, J. L. Garcés, M. Cascante, F. Mas, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1115–1121.
- [291] I. Pastor, L. Pitulice, C. Balcells, E. Vilaseca, S. Madurga, A. Isvoran, M. Cascante, F. Mas, *Biophys. Chem.* **2014**, *185*, 8–13.
- [292] J. Gross, G. Sadowski, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2001**, *40*, 1244–1260.
- [293] K. V. Rajagopalan, I. Fridovich, P. Handler, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 1059–1065.
- [294] D. J. Quirk, D. B. Northrop, *Biochemistry* **2001**, *40*, 847–851.
- [295] R. V. Rariy, N. Bec, J. L. Saldana, S. N. Nametkin, V. V. Mozhaev, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, C. Balny, *FEBS Lett.* **1995**, *364*, 98–100.
- [296] B. van den Berg, R. J. Ellis, C. M. Dobson, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6927–6933.
- [297] J. A. Dix, A. S. Verkman, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 247–263.
- [298] A. P. Minton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 34–39.
- [299] G. Rivas, J. A. Fernandez, A. P. Minton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3150–3155.
- [300] M. G. S. Norris, N. Malys, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *405*, 388–392.
- [301] B. Akabayov, S. R. Akabayov, S. J. Lee, G. Wagner, C. C. Richardson, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1615.
- [302] A. Dhar, A. Samiotakis, S. Ebbinghaus, L. Nienhaus, D. Homouz, M. Gruebele, M. S. Cheung, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 17586–17591.
- [303] K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2101–2107.
- [304] L. Homchaudhuri, N. Sarma, R. Swaminathan, *Biopolymers* **2006**, *83*, 477–486.
- [305] K. Akasaka, H. Matsuki, *High Pressure Bioscience Basic Concepts, Applications and Frontiers*, Dordrecht, **2015**.
- [306] C. Hölzl, P. Kibies, S. Imoto, R. Frach, S. Suladze, R. Winter, D. Marx, D. Horinek, S. M. Kast, *J. Chem. Phys.* **2016**, *144*, 144104.
- [307] P. Ganguly, J. Polák, N. F. A. van der Vegt, J. Heyda, J.-E. Shea, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 6183–6197.
- [308] M. A. Eiteman, J. L. Gainer, *Biotech. Process* **1990**, *6*, 479–484.
- [309] C. Held, T. Stolzke, M. Knierbein, M. W. Jaworek, T. Q. Luong, R. Winter, G. Sadowski,

- Biophys. Chem.* **2019**, *252*, 106209.
- [310] D. Khoshtariya, M. Shushanian, R. Sujashvili, M. Makharadze, E. Tabuashvili, G. Getashvili, *J. Biol. Phys. Chem.* **2003**, *3*, 2–10.
- [311] G. Žoldák, R. Šut'ák, M. Antalík, M. Sprinzl, E. Sedlák, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4887–4897.
- [312] M. Sarkar, C. Li, G. J. Pielak, *Biophys. Rev.* **2013**, *5*, 187–194.
- [313] R. Hanselmann, W. Burchard, R. Lemmes, D. Schwengers, *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196*, 2259–2275.
- [314] D.-M. Smilgies, E. Folta-Stogniew, *J. Appl. Cryst.* **2015**, *48*, 1604–1606.
- [315] J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman, T. C. Fisher, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 4259–4270.
- [316] B. W. Davis, W. M. Aumiller, N. Hashemian, S. An, A. Armaou, C. D. Keating, *Biophys. J.* **2015**, *109*, 2182–2194.
- [317] R. Oliva, S. Banerjee, H. Cinar, R. Winter, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 395–398.
- [318] P. H. Schummel, C. Anders, M. Jaworek, R. Winter, *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 1–13.
- [319] H. Lesch, H. Stadibauer, J. Friedrich, J. M. Vanderkooi, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1644–1653.
- [320] C. Rosin, M. Erlkamp, J. von der Ecken, S. Raunser, R. Winter, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2982–2992.
- [321] H. Herberhold, R. Winter, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2396–2401.
- [322] H. Herberhold, S. Marchal, R. Lange, C. H. Scheyhing, R. F. Vogel, R. Winter, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 1153–1164.
- [323] N. Takeda, M. Kato, Y. Taniguchi, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5980–5987.
- [324] O. Heinisch, E. Kowalski, K. Goossens, J. Frank, K. Heremans, H. Ludwig, B. Tauscher, *Z. Leb. Unters. -Forsch.* **1995**, *201*, 562–565.
- [325] G. Panick, R. Malessa, R. Winter, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6512–6519.
- [326] A. Zipp, W. Kauzmann, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4217–4228.
- [327] G. Panick, G. J. A. Vidugiris, R. Malessa, G. Rapp, R. Winter, C. A. Royer, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4157–4164.
- [328] J. Somkuti, Z. Mártonfalvi, M. S. Z. Kellermayer, L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 112–118.
- [329] J. Wiedersich, S. Köhler, A. Skerra, J. Friedrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5756–5761.
- [330] Y. Taniguchi, A. Okuno, M. Kato, *J. Phys.* **2010**, *215*, 1–4.
- [331] C. R. Robinson, D. Rentzeperis, J. L. Silva, R. T. Sauer, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 692–700.
- [332] J. L. Silva, C. F. Silveira, A. Correia, L. Pontes, *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 545–555.
- [333] I. Hayakawa, Y. Y. Linko, P. Linko, *Leb. u.-Technol.* **1996**, *29*, 756–762.
- [334] K. Müller, T. Seifert, R. Jaenicke, *Eur. Biophys. J.* **1984**, *11*, 87–94.
- [335] K. Ruan, G. Weber, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3295–3301.
- [336] M. Goyal, T. K. Chaudhuri, K. Kuwajima, *PLoS One* **2014**, *9*, 1–23.
- [337] K. Ruan, G. Weber, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2144–2153.
- [338] P. Huang, A. Dong, *Spectroscopy* **2003**, *17*, 453–467.
- [339] M. J. Kornblatt, R. Lange, C. Balny, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3897–3904.
- [340] G. J. Davies, S. J. Gamblin, J. A. Littlechild, H. C. Watson, *Proteins* **1993**, *15*, 283–289.
- [341] D. Deville-Bonne, A. J. Elese, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 747–750.
- [342] H. A. Sathish, P. R. Kumar, V. Prakash, *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 383–390.
- [343] P. T. T. Wong, D. W. Armstrong, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1159*, 237–242.
- [344] A. W. P. Vermeer, W. Norde, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 394–404.
- [345] F. G. De Felice, V. C. Soares, S. T. Ferreira, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 163–169.
- [346] D. Matulis, J. K. Kranz, F. R. Salemme, M. J. Todd, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5258–5266.
- [347] C. A. Royer, G. Weber, T. J. Daly, K. S. Matthews, *Biochemistry* **1986**, *25*, 8308–8315.
- [348] G. I. Makhatadze, K. -S. Kim, C. Woodward, P. L. Privalov, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 2028–2036.
- [349] N. Takeda, K. Nakano, M. Kato, Y. Taniguchi, *Biospectroscopy* **1998**, *4*, 209–216.
- [350] P. Christova, A.-M. Gilles, C. Craescu, *Comptes Rendus l'Academie Bulg. des Sci.* **2000**, *53*, 77–80.
- [351] C. Dirix, F. Meersman, K. Heremans, *High Press. Res.* **2010**, *23*, 63–66.

- [352] I. Karantzeni, C. Ruiz, C. C. Liu, V. J. Licata, *Biophys. J.* **2003**, *374*, 785–792.
- [353] J. K. Yadav, V. Prakash, *J. Biosci.* **2009**, *34*, 377–387.
- [354] S. Schneider, H. Paulsen, K. C. Reiter, E. Hinze, C. Schiene-Fischer, C. G. Hübner, *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 123336-1–13.
- [355] K. Chattopadhyay, S. Mazumdar, *Biochemistry* **2000**, *39*, 263–270.
- [356] J. L. Silva, M. Villas-Boas, C. F. S. Bonafe, N. C. Meirelles, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15863–15868.
- [357] M. Ingr, R. Lange, V. Halabalová, A. Yehya, J. Hrnčířík, D. Chevalier-Lucia, L. Palmade, C. Blayo, J. Konvalinka, E. Dumay, *PLoS One* **2015**, *10*, 1–27.
- [358] C. Garnier, I. Protasevich, R. Gilli, P. Tsvetkov, V. Lobachov, V. Peyrot, C. Briand, A. Makarov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *249*, 197–201.
- [359] E. Girard, S. Marchal, J. Perez, S. Finet, R. Kahn, R. Fourme, G. Marassio, A. C. Dhaussy, T. Prangé, M. Giffard, et al., *Biophys. J.* **2010**, *98*, 2356–2364.
- [360] A. Tanaka, *J. Biochem.* **1998**, *123*, 289–293.
- [361] V. Béghin, H. Bizot, M. Audebrand, J. Lefebvre, D. G. Libouga, R. Douillard, *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 195–200.
- [362] C. Ganesh, A. N. Shah, C. P. Swaminathan, A. Surolia, R. Varadarajan, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5020–5028.
- [363] B. Schuler, W. Kremer, H. R. Kalbitzer, R. Jaenicke, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11670–11680.
- [364] J. W. P. Carvalho, F. A. O. Carvalho, P. S. Santiago, M. Tabak, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *54*, 109–118.
- [365] D. Georlette, B. Damien, V. Blaise, E. Depiereux, V. N. Uversky, C. Gerday, G. Feller, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37015–37023.
- [366] C. G. Benítez-Cardoza, A. Rojo-Domínguez, A. Hernández-Arana, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9049–9058.
- [367] S. H. Park, H. S. Kim, M. S. Park, S. Moon, M. K. Song, H. S. Park, H. Hahn, S. J. Kim, E. Bae, H. J. Kim, et al., *PLoS One* **2015**, *10*, 1–13.
- [368] M. Naderi, A. A. Moosavi-Movahedi, S. Hosseinkhani, M. Nazari, M. Bohlooli, J. Hong, H. Hadi-Alijanvand, N. Sheibani, *Protein Pept Lett.* **2015**, *22*, 23–30.
- [369] S. Fujii, M. Masanari, H. Inoue, M. Yamanaka, S. Wakai, H. Nishihara, Y. Sambongi, *Biosci. Biotech. Biochem.* **2013**, *77*, 1677–1681.
- [370] S. Biswas, A. M. Kayastha, *J. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *35*, 472–475.
- [371] S. Fujiwara, A. Yamanaka, K. Hirooka, A. Kobayashi, T. Imanaka, E. I. Fukusaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 1066–1074.
- [372] H. Uedaira, S. -I. Kidokoro, M. Iwakura, S. Honda, S. Ohashi, *Ann. NY Acad. Sci.* **1990**, *613*, 352–357.
- [373] K. Ogasahara, N. N. Khechinashvili, M. Nakamura, T. Yoshimoto, K. Yutani, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3233–3242.
- [374] R. S. Prajapati, M. Das, S. Sreeramulu, M. Sirajuddin, V. Sankaranarayanan, S. Krishnamurthy, R. Ranjani, C. Ramakrishnan, R. Varadarajan, *Proteins* **2007**, *66*, 480–491.
- [375] H. Klump, J. Di Ruggiero, M. Kessel, J. B. Park, M. W. W. Adams, F. T. Robb, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22681–22685.
- [376] A. Reyes-Alcaraz, M. Martínez-Archundia, E. Ramon, P. Garriga, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2798–2806.
- [377] K. Shiraki, S. Nishikori, S. Fujiwara, H. Hashimoto, Y. Kai, M. Takagi, T. Imanaka, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 4144–4150.
- [378] C. G. Brouillette, R. B. McMichens, L. J. Stern, H. G. Khorana, *Proteins* **1989**, *5*, 38–46.
- [379] T. Rasmussen, M. van de Weert, W. Jiskoot, M. R. Kasimova, *Proteins* **2011**, *79*, 1747–1758.
- [380] A. Barzegar, A. A. Moosavi-Movahedi, J. Z. Pedersen, M. Miroliaei, *Enzym. Microb. Technol.* **2009**, *45*, 73–79.
- [381] S. Kędracka-Krok, Z. Wasylewski, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4564–4573.
- [382] M. J. Feio, J. A. Navarro, M. S. Teixeira, D. Harrison, B. G. Karlsson, M. A. De La Rosa, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14784–14791.
- [383] C. Mottono, T. Oshima, A. Yamagishi, *Protein Eng.* **2001**, *14*, 961–966.

- [384] D. W. Lee, Y. H. Hong, E. A. Choe, S. J. Lee, S. B. Kim, H. S. Lee, J. W. Oh, H. H. Shin, Y. R. Pyun, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 1261–1266.
- [385] M. I. Arnone, L. Birolo, S. Pascarella, M. V. Cubellis, F. Bossa, G. Sannia, G. Marino, *Protein Eng.* **1997**, *10*, 237–248.
- [386] T. Collins, M. A. Meuwis, C. Gerday, G. Feller, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 419–428.
- [387] S. Kanaya, M. Itaya, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10184–10192.
- [388] S. Griffin, C. L. Higgins, T. Soulimane, P. Wittung-Stafshede, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4736–4743.
- [389] H. Nojima, T. Oshima, H. Noda, *J. Biol. Chem.* **1979**, *85*, 1509–1517.
- [390] M. González, C. E. Argaraña, G. D. Fidelio, *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 67–72.
- [391] G. Feller, *J. Phys. Condens. Matter* **2010**, *22*, 1–17.
- [392] C. Qinglong, L. Huizhou, C. Jiayong, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 247–252.

## ii. Publikationsliste

Für die Dissertation wurden aus folgenden Publikationen Inhalte verwendet, die der Autor im Rahmen der Promotion verfasst hat und in Einverständnis mit den Herausgebern verwendet worden sind:

- [1] **M. W. Jaworek**, V. Schuabb, R. Winter, „The Effects of glycine, TMAO and osmolyte mixtures on the pressure dependent enzymatic activity of  $\alpha$ -Chymotrypsin”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20, S. 1347–1354.
- [2] **M. W. Jaworek**, V. Schuabb, R. Winter, „Pressure and cosolvent modulation of the catalytic activity of amyloid fibrils”, *Chem. Commun.* **2018**, 54, S. 5696–5699.
- [3] **M. W. Jaworek**, S. Möbitz, M. Gao, R. Winter, „Stability of the chaperonin system GroEL-GroES under extreme environmental conditions”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, 22, S. 3734–3743.
- [4] **M. W. Jaworek**, A. Ruggiero, G. Graziano, R. Winter, L. Vitagliano, „On the extraordinary pressure stability of the *Thermotoga maritima* arginine binding protein and its folded fragments – a high-pressure FTIR spectroscopy study”, *Phys. Chem. Chem. Phys. Commun.* **2020**, 22, S. 11244–11248.
- [5] S. Gault, **M. W. Jaworek**, R. Winter, C. Cockell, „High pressures increase  $\alpha$ -chymotrypsin enzyme activity under perchlorate stress” *Commun. Biol.* **2020**, 3:550, S. 1–9.
- [6] **M. W. Jaworek**, R. Winter, „Exploring Enzymatic Activity in Multiparameter Space: Cosolvents, Macromolecular Crowders and Pressure”, *ChemSystemsChem* **2020**, 2, e2000029.

Außerdem war der Autor während der Promotionszeit an folgenden Publikationen beteiligt:

- [1] P.-H. Schummel, **M. W. Jaworek**, C. Rosin, J. Högg, R. Winter, „Exploring the influence of natural cosolvents on the free energy and conformational landscape of filamentous actin and microtubules”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20 (45), S. 28400–28411.
- [2] P.-H. Schummel, C. Anders, **M. W. Jaworek**, R. Winter, „Cosolvent and crowding effects on the temperature- and pressure-dependent dissociation process of the  $\alpha/\beta$ -Tubulin heterodimer”, *ChemPhysChem.* **2019**, 20 (9), S. 1098–1109.
- [3] C. Held, T. Stolzke, M. Knierbein, **M. W. Jaworek**, T. Q. Luong, R. Winter, G. Sadowski, „Cosolvent and pressure effects on enzyme-catalysed hydrolysis reactions”, *Biophys. Chem.* **2019**, 252.

### iii. Konferenzbeiträge

- [1] **M. W. Jaworek**, V. Schuabb, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, Combined Effects of Cosolvents, Macromolecular Crowding and Pressure on the Catalytic Activity of Amyloid Fibril Enzymes, Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (9. Februar 2018), Dortmund – **Poster**
  
- [2] **M. W. Jaworek**, V. Schuabb, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, Combined Effects of Cosolvents, Macromolecular Crowding and Pressure on the Catalytic Activity of Amyloid Fibril Enzymes, The 10<sup>th</sup> International high-pressure bioscience and biotechnology Conference (18.-22. September 2018), Numazu, Japan – **Poster (Poster Award)**
  
- [3] **M. W. Jaworek**, S. Möbitz, M. Gao R. Winter, Stability of the Chaperonin System under Extreme Environmental Conditions, Solvation Science meets high pressure bioscience: RESOLV – 10<sup>th</sup> IMPB (International Meeting on Biomolecules under Pressure) – DFG for 1979, (29. September - 3. Oktober 2019), Dortmund – **Poster**
  
- [4] **M. W. Jaworek**, S. Möbitz, M. Gao R. Winter, Stability of the Chaperonin System under Extreme Environmental Conditions, Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (7. Februar 2020), Dortmund – **Poster**